

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MISIR İÇEREN GIDA ve YEM ÇEŞİTLERİNDE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARLA İLGİLİ GENETİK ANALİZLER

Sinan MERİÇ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof.Dr. Şule ARI

Mayıs, 2012

İSTANBUL



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MISIR İÇEREN GIDA ve YEM ÇEŞİTLERİNDE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARLA İLGİLİ GENETİK ANALİZLER

Sinan MERİÇ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof.Dr. Şule ARI

Mayıs, 2012

İSTANBUL

Bu çalışma 19/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Filiz GÜREL
İstanbu Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi
Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 19510 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca, bana olan inancı ve güvenini herzaman hissettiğim, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana her türlü destek ve yardımda bulunan değerli hocam **Prof. Dr. Şule ARI**'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her türlü imkanı sağlayan ve tezim için değerli önerilerde bulunan Bölüm Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Avni KURU**'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında tezim için önerilerde bulunan, bana olan inançlarını ve güvenlerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım **Dr. Neslihan TURGUT KARA** ve **Dr. Özgür ÇAKIR**'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, laboratuvarımızda çalışan bütün araştırmacı arkadaşlarıma, özellikle bu süreçte bana her türlü destek ve yardımda bulunan **Zeynep Seda KUTLU** ve çalışma arkadaşım **Münevver Merve YILMAZ**'a,

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili **AİLEM**'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Mayıs, 2012 **Sinan MERİÇ**

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ

TABLO LİSTESİ

SEMBOL LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
Bç	: Baz çifti
Bt	: *Bacillus thuringiensis*
CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus (Karnabahar Mozaik Virüs)
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromür
dH_2O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincir DNA
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
ECB	: Avrupa mısır kurdu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim bağlı immün assay)
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
EPSPS	: 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz
GD	: Genetiği Değiştirilmiş
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GDB	: Genetiği Değiştirilmiş Bitki
GS	: Glutamin sentetaz
HCl	: Hidroklorik asit
IRMM	: Institute for Reference Materials and Measurements (Referans Materyaller ve Ölçüm Enstitüsü)
ISAAA	: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi)
$MgCl_2$	: Magnezyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
Na_2EDTA	: Disodyum etilendiamin tetra asetik asit
nm	: Nanometre
Nos	: Nopalin sentaz
O.D.	: Optik yoğunluk
PAT	: Fosfinotrisin asetiltransferaz
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PG	: Poligalakturonaz
rDNA	: Rekombinant DNA
RNA	: Ribonükleik asit
SRM	: Sertifikalı Referans Materyal
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
T-DNA	: Transfer DNA
USDA	: United States Department of Agriculture

ÖZET

MISIR İÇEREN GIDA ve YEM ÇEŞİTLERİNDE GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARLA İLGİLİ GENETİK ANALİZLER

Günümüzde genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler konusunda tartışmalara rağmen bu bitkilerin ekim alanları her yıl genişlemeye devam etmektedir. Son yıllarda genetik mühendisliği teknolojisi ile üretilen gıda ve yemler marketlerde yer almaktadır. Genetiği değiştirilmiş ürünlerin kullanımının uzun vadede çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri bakımından kontrollü şekilde üretimi ve tüketiciye sunulması yasal bir zorunluluktur.

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edinilmiş 11 adet yemlik mısır ve bu mısırlardan üretilmiş 11 adet hayvan yemi ile marketlerden satın alınan mısır içerikli 11 adet çeşitli işlenmişlik düzeylerine sahip gıda örneğinde genetik değişikliklerin saptanmasına yönelik olarak yabancı gen temeline dayalı genetik analizler yapıldı. Tüm örneklerde genetiği değiştirilmiş bitkilerde yaygın olarak kullanılan kontrol dizilerinden 35S promotor ve NOS terminatör taranması, geleneksel PCR ile gerçekleştirildi. PCR sonucu genetik değişiklik saptanan yem örneklerinin içerdiği transgenik bitkinin Bt176 mısır ve GTS-40-3-2 soya olup olmadığının araştırılması için ise sırasıyla Nested PCR ve geleneksel PCR analizleri yapıldı.

Yapılan analizler sonucu 11 adedi yem, 3 adedi yemlik mısır ve 1 adedi de gıda olmak üzere toplam 15 adet yabancı gen içeren örnek belirlendi. Transgenik olduğu belirlenen bu örneklerden 3 adet yemlik mısır ve 1 adet gıdanın sadece nos terminatör dizisini taşımaları, bu örneklerdeki transgenik mısır çeşidinin GA21 veya MIR603 olduğunu düşündürdü. Hem 35S hem de NOS terminatör dizisinin birlikte bulunduğu yem örneklerinde Bt176 mısır çeşidine özgü primerler ile gerçekleştirilen Nested PCR sonucunda yem örneklerinin hiçbirinde Bt176 mısır çeşidinin taşıdığı böcek direnci sağlayan cryIA(b) dizisi belirlenemedi. Buna karşılık transgenik soya çeşidi GTS-40-3-2'nin taşıdığı herbisit toleransı sağlayan CP4-EPSPS gen kasedine özgü primerler ile gerçekleştirilen geleneksel PCR sonucunda yem örneklerinin tamamında GTS-40-3-2'ye özgü diziler saptandı.

SUMMARY

GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS RELATED GENETIC ANALYSIS of MAIZE DERIVED FOOD and FEED

Despite to controversy about genetically modified plants, these plants are still cultivated incrementally. In recent years, many food and feed products that produced by genetic engineering technology are found places on the market shelves. Controlling of the production and presentation of genetically modified crops is very important for environment and human health, especially in terms of long term consumption.

In this study, 11 kinds of feed corn which are obtained from different regions in Turkey, 11 kinds of animal feed which are containing feed corn, and 11 different processed corn food were used for genetic analysis based on foreign gene determination. All samples were screened with conventional PCR technique by using widely used genetic elements, 35S promoter and nos terminator squences for GMOs. After the determination of GM containing samples, nested PCR and conventional PCR analysis were performed to find out if the samples are contained Bt176 or GTS-40-3-2 for corn and soy, respectively. As a result of PCR based GMO analysis, totally 15 samples were found as transgenic. Those are 11 of feed samples, 3 of feed corn samples and 1 of food samples. These 3 maize samples and 1 food sample were contained only NOS terminator sequences, so this situation was thought that they might be GA21 or MIR603 transgenic maize line. Both 35S and NOS including feed samples or in other words potential Bt176 containing samples were analysed with Bt176 *cryIAb* gene specific primers via nested PCR. Eventually, none of them were found Bt176 positive. On the other hand, when we applied conventional PCR to the same samples with the CTP4-EPSPS construct specific primers for transgenic soy variety GTS-40-3-2, we found that all samples were positive for GTS-40-3-2.

1. GİRİŞ

Binlerce yıldan beri insanlar bitkilerin özelliklerini bitki ıslahı yöntemleri ile değiştirmişler ve bu yolla çok sayıda bitkinin tarımsal özellikleri iyileştirilmiştir. Ancak, bitki ıslahı eşeysel uyum ve yakın akraba bitkilerin melezlenmesi esasına dayandığı için farklı türler arasındaki özelliklerin aktarılması mümkün olmamıştır. 70'li yıllardan itibaren genetik ve moleküler biyolojide meydana gelen gelişmeler, organizmaların genetik yapılarının mühendislik işlemleriyle tür engeli olmadan değiştirilebilmesini olanaklı hale getirmiştir.

Genetik mühendisliği yöntemleriyle yabancı genler aktarılarak "genetik yapıları" değişikliğe uğratılan ve bu yabancı genleri genomlarında sabit olarak taşıyan özellikleri değiştirilmiş bitki, hayvan ve mikroorganizmalar, "genetik yapısı değiştirilmiş organizma" (GDO) olarak adlandırılmaktadır (Ibelgaufts, 1993).

Nitelikli ürün veren sağlıklı bitki yetiştirmek için üreticilerin sürekli değişen çevresel koşullarla ve zararlılarla mücadele etmesi gereklidir. Bu mücadelede üreticilere yardım etmek için geliştirilen transgenik yaklaşımlar bugün yaygın olarak kullanılmaktadır ve yeni transgenikler geliştirilmeye devam etmektedir (Korth, 2008). Araştırıcılar bu fırsatı; hızla artan ve 2025 yılında 8 milyar olması beklenen dünya nüfusunu beslemek ve giydirmek için kültür bitkilerinin verimini ve kullanılabilirliğini artırmak yönünde kullanmaya çalışmışlardır.

Tarımsal biyoteknoloji ve genetiği değiştirilmiş organizmalar, tarımda klasik ıslah yöntemleri ile çözülemeyen ekonomik öneme sahip bazı sorunların giderilmesinde önemli katkılar sağlamıştır. Genetiği değiştirilmiş organizmaların potansiyel yararları; besin miktarlarının arttırılması ve içeriğinin zenginleştirilmesi, besinlerin alerjik özelliklerinin azaltılması, herbisit ve pestisitlerin kullanımının azaltılması, birim alandan daha fazla verim elde edilmesi ve raf ömrünün uzatılması olarak sıralanmaktadır (Hug, 2008; Azadi, 2010). GDO'ların potansiyel zararları ise;

antibiyotiğe direnç genlerinin doğaya yayılma ihtimali, artmış alerjik reaksiyon riski, doğal türlerde genetik çeşitliliğin kaybı, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların çevreye salınması sonucu doğal dengenin bozulması, virüslerden elde edilen dayanıklılık genlerinin diğer virüslere aktarılarak virüs populasyonunda istenmeyen dayanıklılığın oluşmasından kaynaklanan riskler olarak sıralanabilir (Hug, 2008; Azadi, 2010).

Biyoteknolojik bitkilerin çiftçiler arasında kabul görmesinin en önemli nedeni çiftçilik gelirlerine olan olumlu etkileridir. Üretkenlik ve verimlilik artışı ile çiftçilik gelirlerine olumlu şekilde yansıyan biyoteknolojinin, 2005 yılında bu kapsamdaki katkısı 5 milyar dolar olmuştur (Brookes, 2008).

Günümüzde, yaklaşık olarak genetiği değiştirilmiş 60 bitki onaylanarak piyasaya sunulmuştur. Bu sayının 2015 yılında iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmaların küresel pazardaki artışıyla, bu ürünlerin üretimi, ithalatı ve risk değerlendirmeleri ile ilgili yeni yasal düzenlemelerin oluşturulması zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Bu düzenlemelerden ikisi, Avrupa birliği ülkelerinin tamamının uymakla yükümlüğü olduğu 1829/2003 yönetmeliği ve buna ek olarak düzenlenen (EC) 1830/2003 numaralı yönetmeliktir. Bu ek tüzük AB mevzuatında çok önemli bir yer tutan GDO'lu ürünlerin etiketlenmesine ve izlenebilirliğine yönelik olarak düzenlenmiştir. AB'nin GDO'lara ilişkin yasal düzenlemeleri, genetiği değiştirilmiş gıda ve yemlerin düzenlenmesi için genel bir çerçeve ortaya koymaktadır. Bu yasal düzenlemelere göre % 0.9'dan daha fazla GDO içeren gıdaların etiketlenmeleri gereklidir. Genetiği değiştirilmiş organizmalar ile ilgili düzenlemeler sadece gelişmiş ülkelerde değil Mısır, Burkino Faso ve Bangladeş gibi gelişmekte olan ülkelerde de tartışılmaktadır. Türkiye, genetiği değiştirilmiş ürünlerin ülkeye giriş çıkışını kontrol etmeye başlayan ve 2010 yılında bir biyogüvenlik yasası altında bu konudaki düzenlemeleri ilan eden ülkelerden biridir. Bu yasanın amacı; bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin

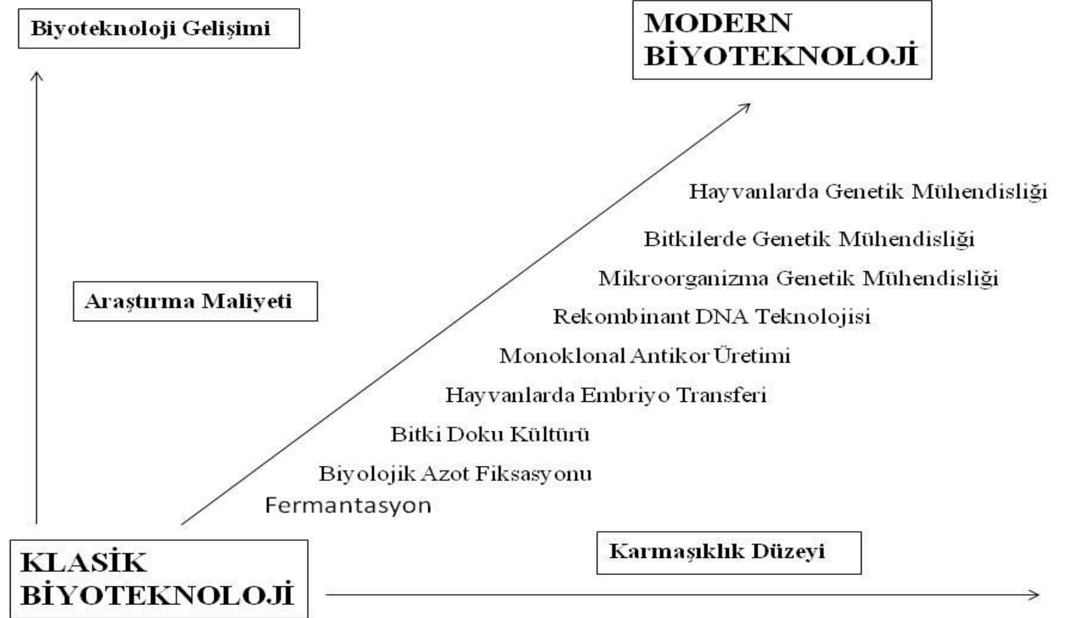
denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esasları belirlemektir (Resmi Gazete, 2010).

Bu tez projesinde, Türkiye'nin farklı bölgelerinden edinilmiş yemlik mısırlar ve bu yemlik mısırların %20-60 hammadde olarak kullanılmasıyla üretilen hayvan yemleri ile mısır içeren çeşitli gıda örneklerinin yabancı DNA taşıyıp taşımadıkları belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, çeşitli yemlik mısırlardan, hem mısır hem de soya içeren yemlerden ve mısır içeren gıdalardan CTAB yöntemi ile DNA izole edilmiş ve mısıra özgü *zein* geni, PCR ile çoğaltılarak örneklerin özgünlüğü (mısır içerdikleri) belirlenmiştir. Karnabahar mozaik virüsünün 35S promotoru ve *Agrobacterium tumafaciens'* e ait nopalin sentaz terminatörüne özgü primerler kullanılarak yapılan standart PCR ile de transgenlerin kalitatif analizi yapılmıştır. Son olarak, 35S promotor ve Nos terminatör dizilerinin tarama sonucunda çoğaltılabildiği DNA örnekleri arasında ''Nested PCR'' yöntemi kullanılarak gen spesifik tarama ile bant büyüklüğüne bağlı olarak Bt-176 transgenik mısır ve standart PCR kullanılarak ''konstrakt spesifik'' (gen kasetine özgün) tarama ile GTS-40-3-2 transgenik soya çeşidi belirlenmiştir. Böylece, Türkiye'deki mısır içeren çeşitli ürünlerin yabancı DNA içerikleri hakkında önemli verilere ulaşılmıştır. Bu veriler, Biyogüvenlik yasasının getirmiş olduğu yükümlülükler çerçevesinde ilgili ürünlerin etiketlenmesi ve izlenebilirliği hakkında fikir vererek bu kapsamdaki araştırmalara katkı sağlayabilecek niteliktedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR

21. yüzyılda insanlığın refahında en önemli katkıyı sağlaması beklenen teknolojilerin başında gelen biyoteknoloji; canlı organizmaların veya canlılığın moleküler temellerini oluşturan kavram ve işleyiş kurallarının kullanımı ile geliştirilen teknolojileri ve ürünlerini kapsayan bir teknoloji alanı olarak tanımlanmaktadır (DPT, 2000). İnsanlık tarihiyle eşdeğer bir geçmişe sahip olan geleneksel biyoteknoloji, son elli yılda moleküler biyoloji ve genetik alanlarında gerçekleşen bilimsel ilerlemeler sayesinde, yepyeni bir anlam ve önem kazanmıştır. Şekil 2.1'de biyoteknolojinin gelişimi verilmiştir.



Şekil 2.1: Biyoteknolojinin gelişimi (Persley, 1990)

1970’li yılların başından beri geliştirilen modern biyoteknoloji teknikleri ile canlıların genetik yapısında geleneksel ıslah metodları ve doğal üreme-çoğalma süreçleri ile elde edilemeyen değişikliklerin yapılması mümkün olmuştur (Campbell, 2008). Restriksiyon enzimlerinin kullanımına bağlı olarak rekombinant DNA teknolojisi hızla gelişmiş ve bu gelişme seçilen bir genin çoğaltılmasını, genin anlatım yaptığı proteinin üretilmesini, genin diziliminin belirlenmesini ve bu gende değişimler yapılabilmesini mümkün hale getirmiştir. Stanley Cohen ve Herbert Boyer’in DNA’nın klonlanmasına olanak tanıyan çalışmaları bu seçici üretme işinin, daha kesin ve önceden bilinecek bir biçimde yapılması ve daha geniş bir alana uygulanmasını sağlamıştır. 1970’li yılların ikinci yarısındaki gelişmeler ise DNA analiz yöntemlerinin geliştirilmesi (Sagner-Barrel ve Maxam Gilbert, 1975), insan büyüme hormonunun bakteride klonlanması (1977) ve insülin genlerinin *E.coli’ye* aktarılarak insülin üretilmesi (1978) şeklinde belirtilebilir. Bu gelişmeler 1980’li yıllarda insan büyüme hormonu üreten gen aktarılmış farenin geliştirilmesi (1982), rekombinant Hepatit-B aşısının üretilmesi (1987) ve transgenik bitkilerin üretimi için yeni metodlar kullanarak, domatesin uzun sürede olgunlaşmasını sağlayan çalışmalar (1987) ile devam etmiştir. 90’lı yıllara gelindiğinde raf ömrü uzatılmış ‘‘Flavr Savr’’ domates ilk genetiği değiştirilmiş ticari ürün olarak satışa sunulmuştur (Kramer ve Redenbaugh, 1994). Çalışmalar, ilk memeli canlının klonlanması (1997) ve kök hücre çalışmaları ile günümüze kadar ulaşmıştır. Günümüzdeki uygulamalar; yeni ilaçların üretimi, transgenik bitki ve hayvanların elde edilmesi, biyolojik yakıt elde edilmesi, gen terapileri ve çevre kirliliğini önlemeyi içeren çok farklı araştırma alanlarını kapsamaktadır.

Bir süreden beri, tarımsal üretimi artırmak amacıyla bilim insanları rekombinant DNA teknolojisini kullanmaktadırlar. Bu şekilde geç olgunlaşma, verim artırma, böceklere, herbisitlere ve hastalıklara karşı direnç gösterme gibi istenen özellikleri şifreleyen genlere sahip olan genetiği değiştirilmiş bitkiler elde edilmiştir (Campbell, 2008).

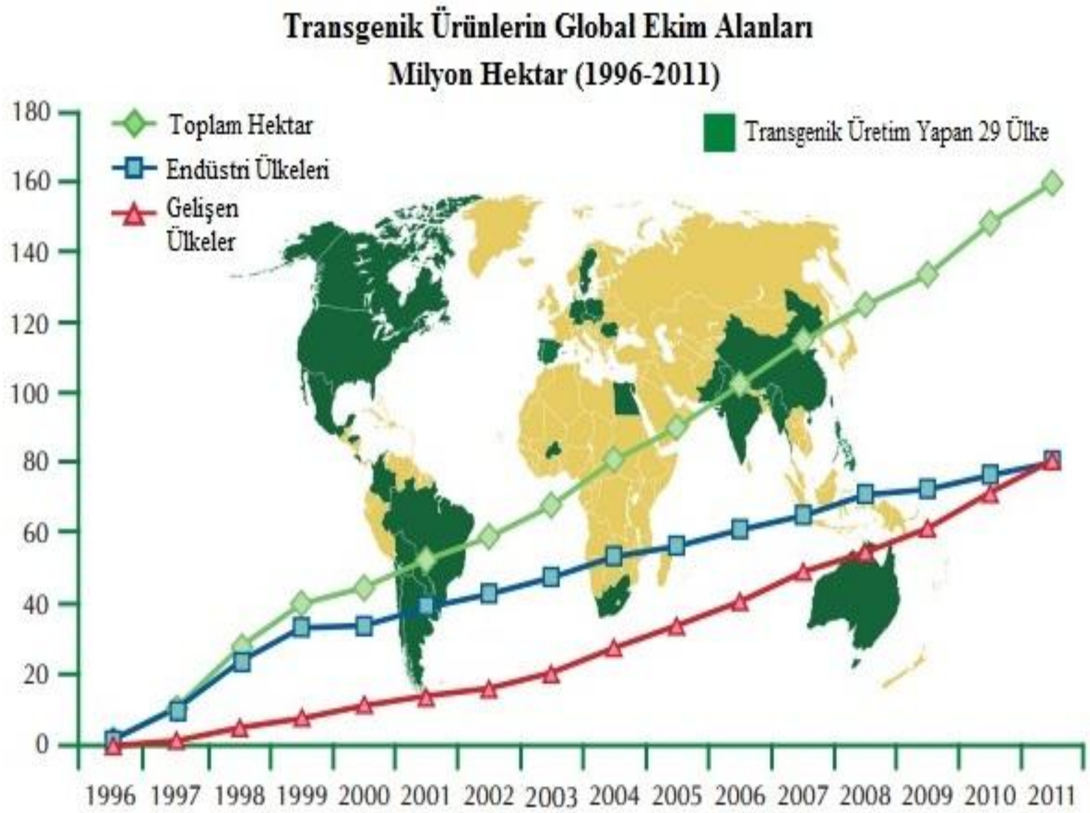
GDO’lu ürünlerin ekim alanlarının hızlı bir şekilde genişlemesi ile 2010 ve 2011 yılları arasında yaklaşık 12 milyon hektarlık ekim alanı artışı olmuştur. Böylece bir önceki döneme oranla %8’lik bir büyüme ile 2010 yılında 148 milyon hektar olan

ekim alanı 2011 yılında 160 milyon hektar alana ulaşmıştır (Tablo 2.1). Başka bir ifade ile, 1994 yılında ilk kez ticarileştirilmelerinden bu yana 94 kat artarak yakın tarihimizin en hızlı uyum sağlanan ürün teknolojisi olmuştur.

Tablo 2.1: Dünyada Transgenik Bitkilerin Toplam Ekim Alanı (James, 2011)

YIL	Ekim Alanı (Milyon ha)	ARTIŞ (%)
1996	1.7	-
1997	11	547.0
1998	27.8	153.0
1999	39.9	4.0
2000	44.2	11.0
2001	52.6	19.0
2002	58.7	12.0
2003	67,7	15.0
2004	81.0	19.0
2005	90.0	11.0
2006	102.0	13.0
2007	114.0	12.0
2008	125.0	9.6
2009	134.0	7.0
2010	148.0	10.0
2011	160.0	8.0

2011 yılında GD bitki üretimi yapan 29 ülkenin 19'u gelişmekte olan, 10'u ise gelişmiş ülkelerdir (Tablo 2.2). GD bitki üretimi yapan ilk 10 ülkenin her biri 1 milyon Ha'dan fazla alanda GD ürün yetiştirmiş ve bunlar gelecekte farklı alanlarda büyümeyi sağlayacak geniş tabanlı küresel oluşumu elde etmişlerdir. 2011 yılında dünyada üretilen GD bitkilerin ekim alanı bazında yaklaşık % 50'si gelişmekte olan ülkeler tarafından üretilmiş olup bu oranın 2012 yılında gelişmiş ülkelerin ekim alanından daha fazla olacağı tahmin edilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Transgenik bitkilerin global ekim alanları (James, 2011)

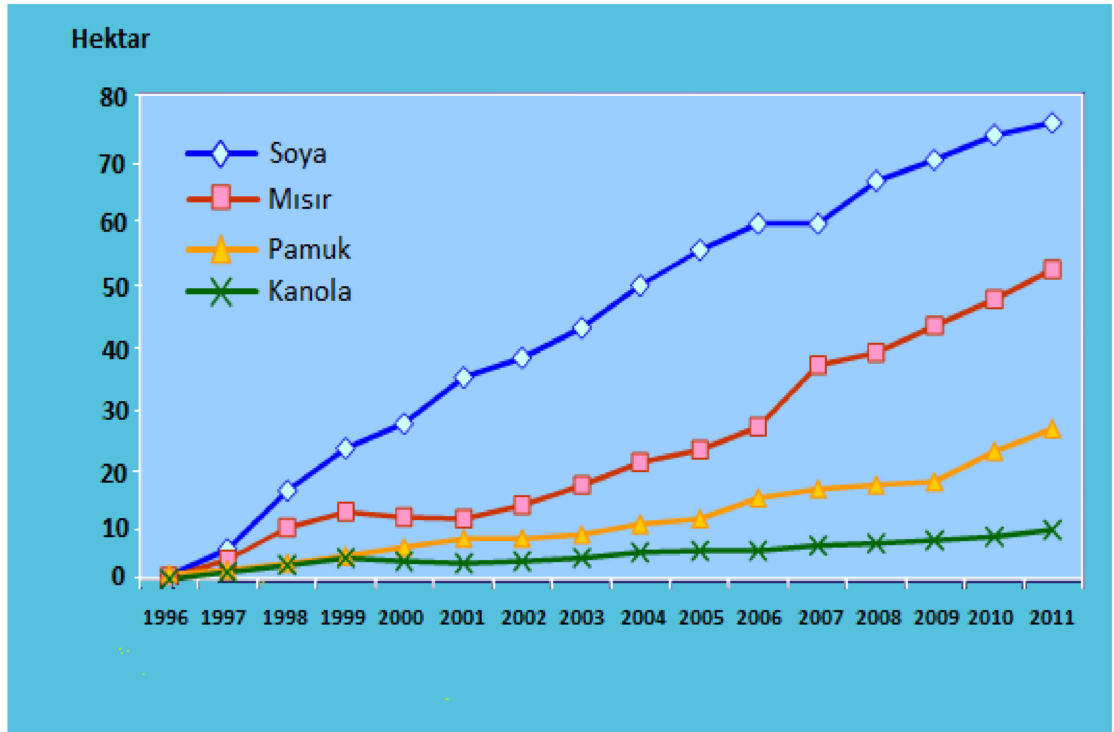
GDO bitki üretiminde ilk 5 ülke; Asya kıtasında Hindistan ve Çin Halk Cumhuriyeti, Güney Amerika kıtasında Brezilya ve Arjantin ile Afrika kıtasında Güney Afrika'dır. Bu ülkelerin, 2100 yılında 10.1 milyar nüfusa ulaşması tahmin edilen dünyanın toplam nüfusunun günümüz itibariyle %40'ını oluşturduğunun bilinmesi gerekir. GDO'lu üretimin sürdürülebilir tarım üzerine çeşitli katkıları bulunmaktadır. Bu katkıların en önemlileri, bu güne kadar 78,4 milyar $ değerinde üretim artışı, 443 milyon kg zirai ilaç aktif maddesinin kullanımının önlenmesi olarak sıralanabilir. GDO'lu üretim sadece 2010 yılında 19 milyar kg CO_2 emisyonunun azaltılmasını sağlayarak iklim değişikliğinin önlenmesinde de önemli katkılarda bulunmaktadır. Ayrıca GDO üretimi, gelir düzeyine göre dünyadaki en fakir insan grubunda bulunan 15 milyon küçük üreticinin yoksullukla mücadelesine de yardımcı olmuştur (James, 2011).

Tablo 2.2: Transgenik Ürünlerin Global Alanı, 2011 (Milyon Hektar) (James, 2011)

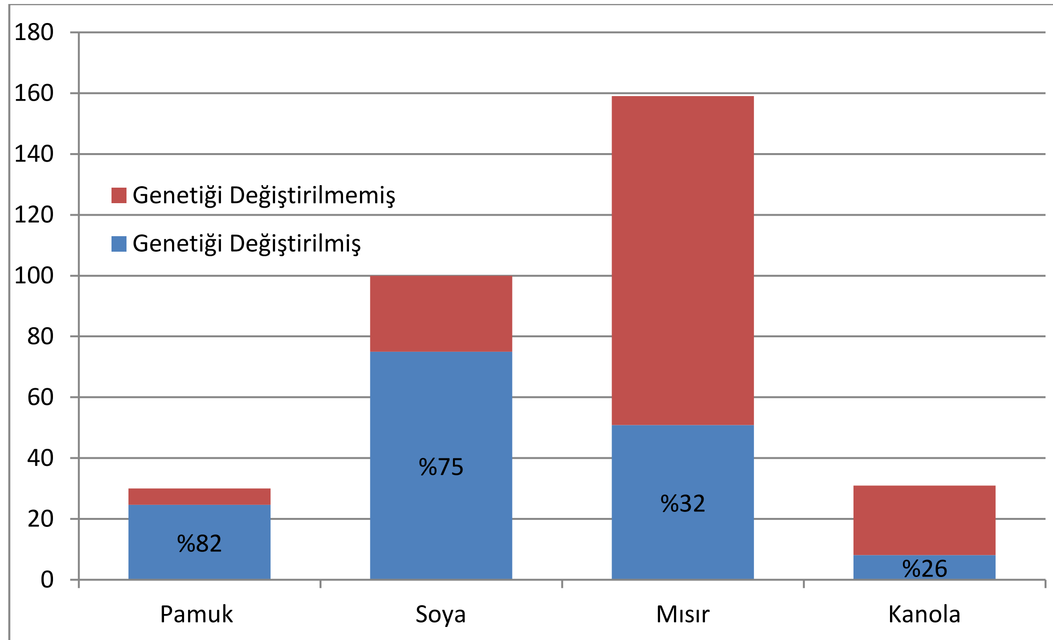
Sıra	Ülke	Alan (Milyon Hektar)	Transgenik Ürünler
1	USA*	99	Mısır, soya, pamuk, kanola, kabak şekerpancarı, alfalfa, papaya,
2	Brezilya*	30.3	Soya, mısır, pamuk
3	Arjantin*	23.7	Soya, mısır, pamuk
4	Hindistan*	10.6	Pamuk
5	Kanada*	10.4	Kanola, mısır, soya, şekerpancarı
6	Çin*	3.9	Pamuk, papaya, kavak, domates,
7	Paraguay*	2.8	Soya
8	Pakistan*	2.6	Pamuk
9	Güney Afrika*	2.3	Mısır, soya, pamuk
10	Uruguay*	1.3	Soya, mısır
11	Bolivya*	0.9	Soya
12	Avustralya*	0.7	Pamuk, kanola
13	Filipinler*	0.6	Mısır
14	Myanmar*	0.3	Pamuk
15	Burkina Faso*	0.3	Pamuk
16	Meksika*	0.2	Pamuk, soya
17	İspanya*	0.1	Mısır
18	Kolombiya	<0.1	Pamuk
19	Şili	<0.1	Mısır, soya, kanola
20	Honduras	<0.1	Mısır
21	Portekiz	<0.1	Mısır
22	Çek Cumhuriyeti	<0.1	Mısır
23	Polonya	<0.1	Mısır
24	Mısır	<0.1	Mısır
25	Slovakya	<0.1	Mısır
26	Romanya	<0.1	Mısır
27	İsviçre	<0.1	Patates
28	Kosta Rika	<0.1	Pamuk,soya
29	Almanya	<0.1	Patates
	Toplam	**160.0**	

* 17 ülke toplamda 50.000 hektardan daha fazla transgenik üretim yapmaktadır.

Genetiği değiştirilerek çeşitli özellikler kazandırılan en önemli tarım bitkileri mısır, soya, pamuk ve kanola olarak belirtilmektedir (Şekil 2.3). Bu bitkilerin küresel GD ekim oranları ise Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



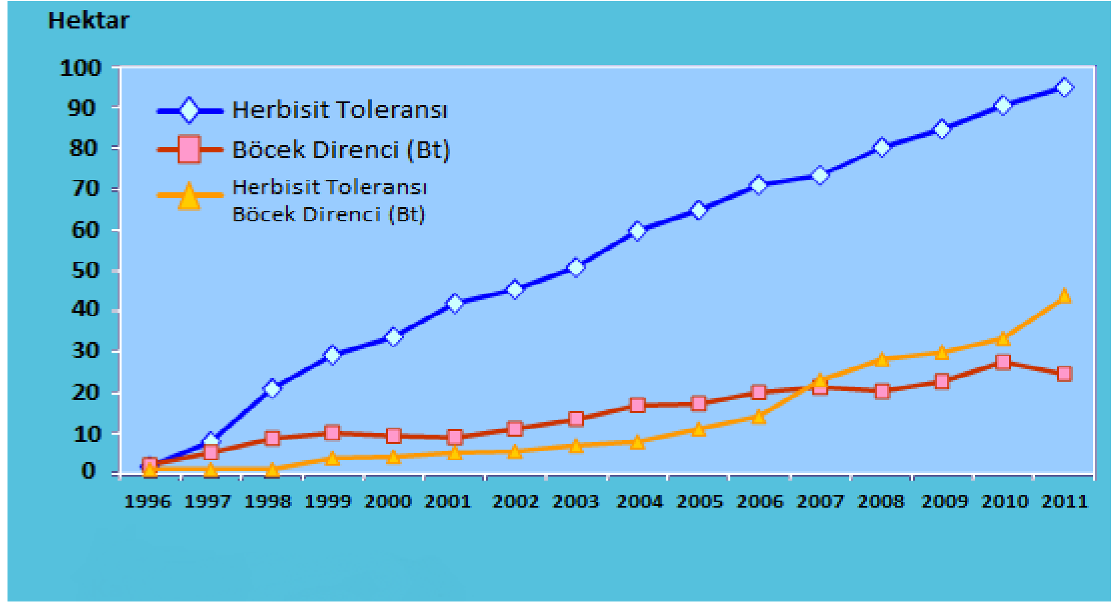
Şelik 2.3: Önemli transgenik bitkilerin küresel durumu (James, 2011)



Şekil 2.4: Ürünlere göre küresel GD bitki ekim oranları (ISAAA, 2011)

Transgenlere kazandırılan en önemli özellikler ise böcek direnci, herbisit toleransı ve bu iki özelliğin birlikte kazandırılması olarak sıralanabilir. Küresel ekim alanı olarak da herbisit toleranslı transgenik bitkilerin ekim alanları, sadece böcek direncine sahip

transgeniklerin ekim alanlarından ve böcek direnci ile herbisit toleransına birlikte sahip olan bitkilerin ekim alanlarından daha fazladır (Şekil 2.5).



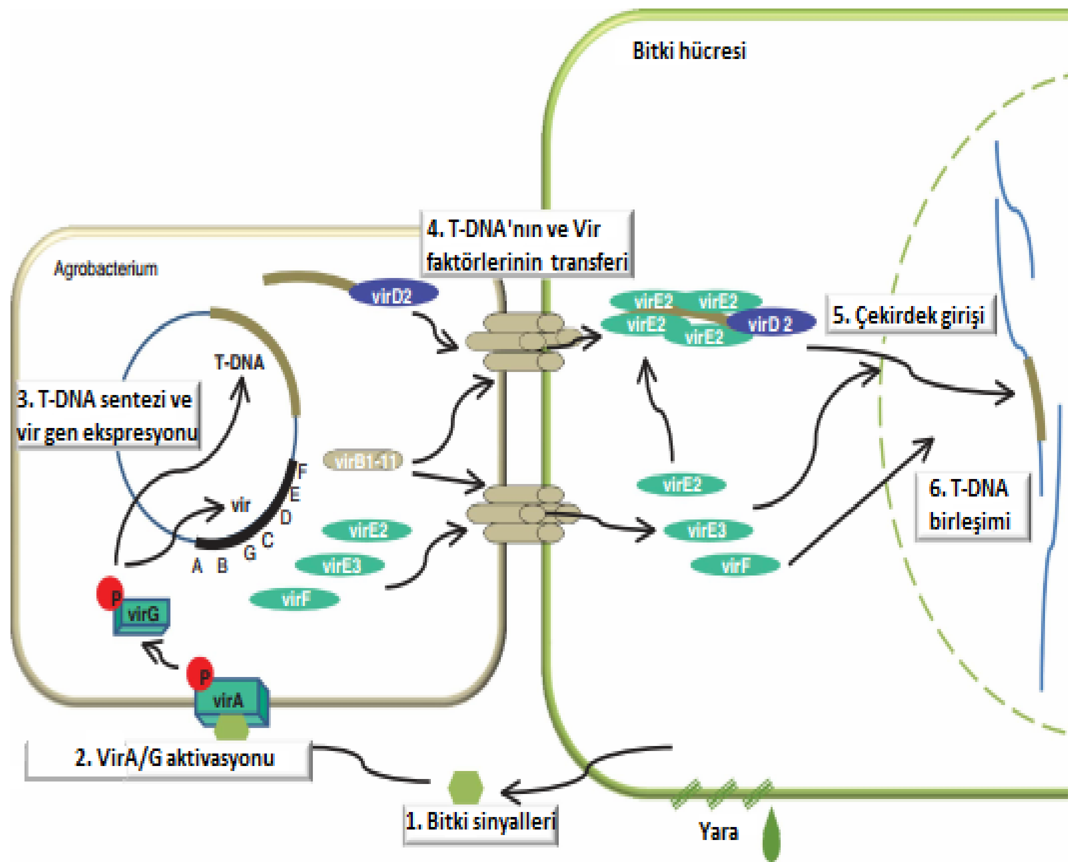
Şekil 2.5: Transgeniklere kazandırılan özellikler (James, 2011)

2.2. GENETİK MODİFİKASYON

Gen aktarımı; tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının yerleştirilmesi ve gen aktarılmış hücrelerden yeni bitkilerin elde edilmesidir. Bitkilere gen aktarımı, dolaylı (*Agrobacterium* aracılı) ve doğrudan (en yaygın kullanılanları elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve biyolistik) olmak üzere iki grup altında toplanabilmektedir (Arı, 2001).

Agrobacterium, *Rhizobiaceae* familyasından, toprakta yaşayan gram negatif bir bakteridir. İki çenekli (dikotiledon) bitkilerde *A. tumafaciens* kök boğazı tümör, *A. rhizogenez* ise saçak kök oluşumuna neden olmaktadır. Tümör oluşumuna bazı monokotil bitkilerde de rastlanmaktadır. Tümör oluşturan *Agrobacterium* bakterileri ile yapılan çalışmalar sayesinde tümör oluşumu ve opin sentezinin, bakteride bulunan plazmid üzerindeki hareketli DNA parçası (T-DNA) ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Zaenen ve ark., 1974; Watson ve ark.,1975; De la Riva ve ark., 1998). *Agrobacterium* bakterisi ile yapılan diğer araştırmalar, T-DNA'daki sınır dizileri

arasına yerleştirilen bir DNA parçasının bitki hücresine aktarılabildiğini göstermiştir. Ayrıca plazmid üzerindeki tümör oluşturan genlerin restriksiyon enzimleri ile T-DNA bölgesinden çıkarılmasının da bitki hücresine gen aktarımını engellemediği belirlenmiştir (Leemans ve ark., 1982). Çeşitli kaynaklardan izole edilen tarımsal öneme sahip genler T-DNA bölgesine yerleştirilip, bitki doku ve hücreleri bu *Agrobacterium* hatlarıyla enfekte edilirse istenilen özellikleri taşıyan genler bitki hücrelerine aktarılmış olur. Şekil 2.6 *Agrobacterium* aracılı transformasyon mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 2.6: *Agrobacterium* aracılı transformasyon mekanizması

Agrobacterium sisteminin tahılların da içinde bulunduğu tek çenekli bitkilerde kullanımının sınırlı kalması, DNA'nın doğrudan aktarılabilmesi için gerekli yöntemlerin geliştirilmesi yolundaki çalışmaları hızlandırmıştır. Doğrudan gen aktarım yöntemleriyle, gen dizilerinin transferi bir aracıya ihtiyaç duymadan gerçekleştirilebilmektedir. Biyolistik, elektroporasyon, protoplast füzyonu ve mikroenjeksiyon gibi alternatif doğrudan gen aktarımı yöntemleri vb. teknikler

tarımda yeni çeşitlerin geliştirilmesinde sınırsız olanaklar sunmaktadır. Bitkilerin genetik yapısını değiştirerek geliştirmekteki amaç onlara çeşitli çevresel baskılara, zararlılara, bakteriyel, fungal ve viral hastalıklarla, herbisitler ve pestisitler gibi çeşitli kimyasallara karşı dayanıklılık özelliği kazandırmak, ayrıca elde edilecek ürünün görünüşünü, besin değerini, işleme veya muhafazaya ilişkin özelliklerini iyileştirmek suretiyle ürün kalitesini yükseltmektir. Yaklaşık 60 bitki çeşidinde transformasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu bitkilerden bazıları Tablo 2.3'te gruplandırılmıştır.

Tablo 2.3: Genetiği değiştirilmiş bitkiler (Kempken ve Kempken, 2004)

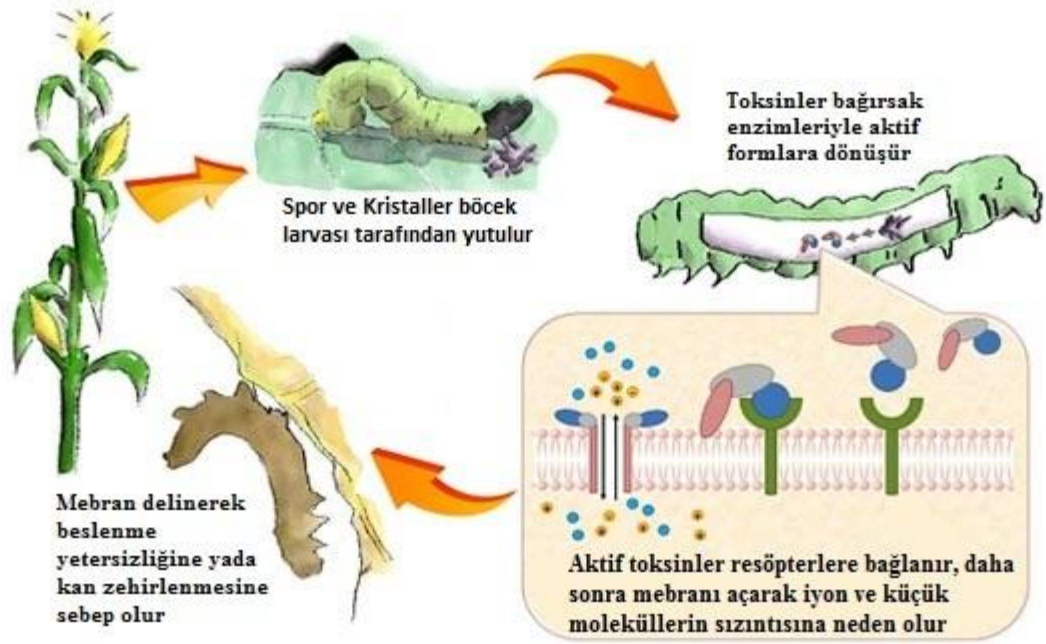
Tarla Bitkileri	**Meyve**	**Sebze**	**Süs Bitkileri**
Arpa	Elma	Patlıcan	Menekşe
Darı	Muz	Karnabahar	Gül
Mısır	Armut	Brokoli	Nergis
Çeltik	Çilek	Bezelye	Petunya
Çavdar	Ahududu	Havuç	Pelargonie
Sorgum	Üzüm	Patates	Karanfil
Buğday	Karpuz	Lahana	Gerbera
Pamuk	Y. mersini	Marul	Geranie
Pancar	Erik	Kabak	Krizantem
Turp	Papaya	Zeytin	
Yonca	Portakal	Domates	
Kolza	Kavun	Patates	
Şalgam	Kivi		
Hardal	Kiraz		
S. fasülyesi	Kahve		
Tütün			
Ş. Pancarı			
Ş. Kamışı			

2.3. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLERE KAZANDIRILAN ÖZELLİKLER

Bitkilerde tek bir genin veya küçük bir gen grubunun eklenmesi ile bitkilere kazandırılan özelliklerden dünya üzerinde en yaygın ekim alanı olanlar; böceklere dayanıklılık, herbiside dayanıklılık, besin kalitesinin iyileştirilmesi olarak sıralanmaktadır. Bunun yanında bitkilere kazandırılan fakat daha az ekim alanına sahip olan diğer özellikler; viral enfeksiyona tolerans, meyve olgunlaşmasının ve çiçek pigmentasyonunun değiştirilmesi ve döllenmede kendine uyuşmazlıkla ilişkili olmuştur (Greenberg ve Glick, 1993).

2.3.1. Zararlılara dayanıklılık

Zararlı böceklerle mücadele edilmediği durumda bazı bitkilerde oldukça yüksek sayılabilecek kayıplar oluşabilmektedir (Duck ve Evola, 1997). Böcekler, bir taraftan bitki dokularını yiyerek bitkilere mekanik zarar vermekte, diğer taraftan virüs, mantar ve bakteri gibi hastalık etmenlerinin bulaşmasına sebep olmaktadır (Demir ve ark., 2005). Günümüzde moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler sayesinde zararlılarla mücadelede gen teknolojisi yöntemleri kullanılabilir duruma gelmiştir. Böcek dirençliliği için kullanılan genler doğal ve sentetik *Bacillus thuringiensis (Bt) delta*-endotoksin proteinlerinin sentezinden sorumlu olan *cry* genleridir. Bt endotoksin proteinleri, Höfte and Whitely (1989) tarafından yapısal özellikleri ve konukçu profillerine göre 4 farklı grupta kategorize edilmiştir. Cry toksinleri başta Lepidoptera (Cry-I ve Cry-II) olmak üzere Coleoptera (Cry-III) ve Diptera (CryII ve CryIV) üzerinde de etkin olabilmektedir (Öktem, 2004). Böcekler tarafından alınan toksinler orta bağırsak bölgesinde çözüldükten ve aktif formlara dönüştükten sonra aktif bölgeleri, bağırsak epitel hücrelerindeki reseptörlere bağlanır ve hücre zarında delikler oluşturarak hücrelerin patlamasına neden olurlar (Gill ve ark., 1992, Şekil 2.7). Böceklere etki gösteren diğer proteinler ise; proteinaz inhibitörleri, α-amilaz inhibitörleri, lektinler, avidin, kolestrol oksidaz ve VIP (vegetative insectisidal proteins) proteinleri olarak sıralanabilir. Mısır bitkisine aktarılan böceklere direnç genleri Tablo 2.4’te gösterilmiştir.



Şekil 2.7: Bt endotoksinlerinin etki mekanizması

Tablo 2.4: Mısır bitkisine aktarılan böceklere direnç genleri (Öktem, 2004)

Gen	Tipi	Hedef Böcek	Kaynak
CryIA(b)	***S***	***Ostrinia nubilalis***	**Koziel ve ark., 1993**
Cry9C	**D**	***Diatrea grandiosella***	**Lambert ve ark., 1996**
CryIA(b)&(c)	**S**	***Ostrinia nubilalis***	**Bohorova ve ark., 1999**

2.3.2. Hastalıklara Dayanıklılık

Zararlı mikroorganizma ve böcek saldırılarına karşı korunma, tarımsal üretimdeki başlıca sorunlardandır. İnsanoğlunun bitki yetiştirmeye başlamasından bu yana, mantar hastalıkları ürün kaybının en önemli nedenlerinden biri olmuştur (Oerke ve ark., 1994). Günümüzde mantar hastalıklarının yaygınlaşmasının kontrol edilmesi esas olarak 3 önemli stratejiyi kapsamaktadır. Bu stratejilerden ilki; ürün rotasyonu, istila edilen toprağın yayılmasının önlenmesi ve kontamine olmuş bitki materyalinin kontrol edilmesi gibi ziraat teknikleridir. İkincisi, dirençli tohum ıslahı ve üçüncüsü de tarımsal kimyadır.

Geleneksel bitki ıslahı dirençli tohum geliştirilmesiyle önemli hastalıklar karşısında kayda değer bir rol oynamasına rağmen, melezleme ve geri melezlemenin zaman alan süreçleri ve istenilen dirençli neslin seçimindeki zorluklar, geleneksel bitki ıslahının yeni gelişmiş zararlı mantar türlerine yeteri kadar etki etmesini zorlaştırmaktadır (Andrade, 1999; Colon, 1999).

Bununla birlikte bitki ıslah teknikleriyle önemli mantar hastalıklarına karşı çözüm üretilmekte zorlanılmaktadır. Bu nedenle çiftçiler modern tarımda ürünün korunması için mantar hastalıklarından koruyucu ilaçlar kullanmışlardır. Ancak bu kimyasal bileşiklerin kullanımı yüksek maliyetleri ve çevre üzerindeki potansiyel zararlı etkileri nedeniyle sınırlandırılmıştır (Hallberg, 1989; Anon, 1998).

Artan çevre kirliliği sonucu duyulan endişelerle birlikte üretim maliyetini düşürmek için yapılan araştırmalar daha az kimyasal ilaç gerektiren üretimin geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Gelişmiş moleküler teknikler ve bitkilerin transformasyonu fungal hastalıklara karşı direnci arttırabilmek amacıyla, tohumların genetik olarak geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır.

Bitkiler patojen enfeksiyonunu sınırlamak için farklı savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bunlar arasında, küçük antibiyotik moleküllerin üretilmesi, yaralanmış bölgedeki konak hücrelerin ölmesi, hücre duvarlarının ligninleşmesi ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi olarak sıralanabilir.

Virüsler, bakteriler, mantarlar ve nematotlara karşı sistematik olarak edinilen dayanıklılık birçok sayıdaki dayanıklılık geninin beraber hareket etmesiyle ortaya çıkmaktadır.

2.3.3. Herbisitlere Dayanıklılık

Tarımsal alanlarda yabancı otlar nedeniyle verimde oluşan kayıp dünya çapında % 10-15 olarak tahmin edilmektedir. Bu nedenle, yabancı otların kontrolü için herbisitler kullanılmaktadır. Seçici olarak etki eden herbisitler belli morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip yabancı otları öldürmektedirler.

Gen aktarımı yoluyla kazandırılan herbisitlere dayanıklılık genel olarak iki farklı mekanizmayla ele alınabilir. Bunlardan ilki herbisitlerin etki ettiği alanı herbisitin zarar getiremeyeceği şekilde değiştirerek bitkiye tolerans sağlamaktadır. Diğer mekanizma ise herbisitlerdeki etkin maddeyi inaktif hale getiren proteinleri kodlayan dayanıklılık genlerinin aktarılması ile dayanıklılığın kazandırılmasıdır. Bu dayanıklılık genleri ya mikroorganizmalardan ya da doğal olarak bu genlere sahip dayanıklı bitkilerden izole edilmektedir (Öktem, 2004).

Bu çalışmalardan biri herbisit türü olan glufosinat ile gerçekleştirilmiştir. Glufosinat'ın sentetik anoloğu bir bakteri türü olan *Streptomyces hygroscopicus* tarafından sentezlenmektedir. Aynı bakteri, bu herbisite dayanıklılık genini de taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda bakteriden izole edilen bu gen herbisite hassas bitkilere aktarılmıştır. Bu şekilde herbisit toleranslı mısır ve şekerpancarı bitkileri elde edilmiştir (Thomzik, 1996).

2.3.4. Strese Dayanıklılık

Yeni genlerin keşfi, abiyotik strese karşı tepkide bu genlerin anlatım şekillerinin belirlenmesi ve strese adaptasyon konusunda bunların rollerinin iyi anlaşılması, daha fazla stres toleransına öncülük edecek etkili DNA teknolojilerinin temellerini sağlayacak değerdedir (Cushman ve Bohnert, 2000). Sıcaklık, soğuk, su eksikliği, yüksek tuzluluk veya ağır metallere karşı toleransın bitkilere kazandırılması bunların ekstrem alanlarda yetiştirilmesini mümkün kılacaktır. Gen teknolojisi kullanılarak farklı koşullara toleranslı bitkilerin geliştirilmesi henüz başlangıç aşamasındadır. Ancak *Mn-SOD* geninin tütün bitkisine (*Nicotiana tabacum*) aktarılması sonucu, aktif oksijenin yaygın bir formu olan süperoksit anyonunun süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen perokside ve daha sonra da katalazların herhangi biriyle suya dönüştürülerek detoksifiye olmaları sağlanmıştır. Böylelikle tütün bitkisinde aktif oksijene tolerans gerçekleştirilmiştir (Greenberg ve Glick, 1993). Bunun yanı sıra trehalozun anlatımını yapan *TPS* geninin (trehaloz sentaz geni) mısır ve tütün (Zhang, 2005) bitkisine aktarılması sonucu kurumaya karşı dayanıklı hatlar elde edilmiştir.

Soğuğa karşı toleransı artırmak için kloroplast membranlarının lipitler ile doyurulmasına katkıda bulunan genler tercih edilmektedir. Buna örnek olarak kabak bitkisinden, tütüne aktarılan gliserol-3-fosfat-asiltransferaz oluşumundan sorumlu cDNA'nın soğuğa karşı tolerans sağlaması verilebilir (Moon ve ark., 1995). Ayrıca, *Pseudopleuronectes americanus* balığında tanımlanan antifiriz proteinini şifreleyen *AFP* geninin tütün ve domates bitkilerine aktarılmasıyla dona dayanıklı transgenik bitkiler üretilmiştir (Nottingham, 1998). Tuza karşı dayanıklılığın arttırılması için farklı stratejiler vardır. Transgenik çeltikte örneğin glutamin-sentetaz enziminin fazla ürettirilmesi ile tuza karşı tolerans arttırılırken (Hoshida ve ark., 2000), *Athrobacter globiformis*'den *Arabidopsis'e* kolinoksigenaz geninin aktarılması, bitkilerde glisin-betainlerin birikimine ve böylece tuza karşı dayanıklılığın artmasına sebep olmuştur (Kempken, 2004).

2.3.5. Kimyasal İçeriğin Değiştirilmesi

Besin maddelerinin içeriğini değiştirmedeki amaç, içeriği oluşturan maddeleri beslenme ve gıda fizyolojisi açısından daha uygun formlara dönüştürmek, bu maddeleri içermeyen ya da az bulunduran bitkilere aktararak zenginleştirmektir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde insan sağlığı açısından önemli olan, mineral maddeler, vitaminler ve iz elementler yeterince alınamamaktadır.

Son yıllarda besleyici değeri zenginleştirilmiş GDO'lara önemli bir örnek olarak altın pirinç, ‘‘golden rice" verilebilir. Tohum hücrelerinin beta karoten üretmesi için pirinç bitkisinin genomuna, beta karoten sentezinde anahtar enzimlerden sorumlu olan genler aktarılmıştır. Gen aktarılmış bu pirincin taneleri parlak sarı-yeşil renkte olduğu içinde bu ürüne "altın pirinç" adı verilmiştir (Schaub, 2005). Karotenoidlerden biri olan beta-karoten doğal bir bitki pigmentidir ve yoğun olarak renkli meyvelerde, havuçta ve yeşil sebzelerde bulunmaktadır. Yetersiz beslenme sonucunda A Vitamini eksikliği ölümcül hastalıklara neden olabilmektedir. ISAAA 2000 raporuna göre 134 milyon çocuk A vitamini eksikliğine bağlı hastalıklar bakımından risk altında bulunmaktadır. Bu insanların temel besini olan pirinçte gen transferi yöntemiyle A vitamini öncüsü olan β-karoten miktarının arttırılmasıyla altın pirinç projesi gercekleşmiştir (Al-Babili ve diğ., 2001).

2.3.6. Kalite iyileştirme

Bu kapsamda yapılan ilk transgenik değişiklikler, ürünlerin depolanma süresini ve dayanıklılığını artırmak amacıyla olgunlaşma süresini değiştirmek üzerinde yoğunlaşmıştır. Olgunlaşma süresi bitkilerdeki etilen oranının düşürülmesi ile geciktirilebilmektedir. Bu da domates kökenli aminosiklopropan-karboksilat-sentaz27 (*ACC*) geni ile başarılmıştır (Quing-hu, 1997).

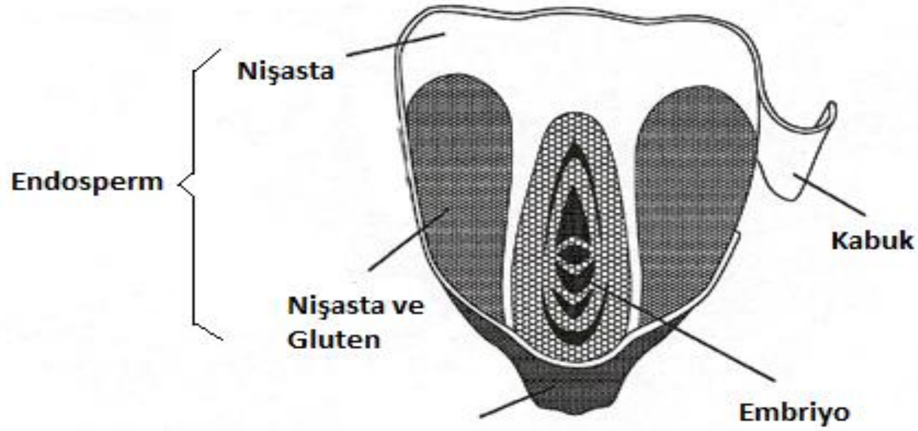
Olgunlaşma süresi ile ilgili diğer bir yol piyasaya sürülen ilk transgenik bitki olan Flavr Savr domateste denenmiş, poligalakturonaz (PG) enziminin gen anlatımını düzenlemek amacıyla antisens RNA teknolojisi kullanılmıştır (Sheehy ve diğ., 1987). PG enzimi meyvenin olgunlaşması sırasında pektin metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimdir, olgun domates meyvesinde en bol bulunan proteindir ve meyvenin yumuşamasından sorumludur (Hobson, 1965 ; Brady ve diğ., 1985). PG geninin anlatımını azaltacak antisens RNA teknolojisi, olgunlaşan domateste pektin yıkımının azalmasına neden olduğundan domates uzun süre taze kalabilmektedir (Kramer ve diğ., 1992).

2.4. MISIR

Buğdaygiller (*Poaceae=Gramineae*) familyasının bir üyesi olan Mısır (*Zea mays* L.)'ın kökeni yıllar boyunca tartışma konusu olmakla birlikte, yabani teosinteden (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) köken aldığı görüşü geniş ölçüde kabul görmektedir. Mısırın taksonomisi Tablo 2.5'de verilmiştir. Şekil 2.8'de ise mısır tohumunun yapısı şematize edilmiştir.

Tablo 2.5: Mısırın taksonomisi (USDA, 2012)

Alem	Plantae
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Liliopsida
Takım	Poales
Aile	Poaceae
Cins	Zea
Tür	*Zea mays*



Şekil 2.8: Mısır tohumunun yapısı (May, 1987)

Mısır dünyada tahıllar içinde ekim alanı bakımından üçüncü, üretim açısından ilk sırada yer alan önemli bir tahıl cinsidir (Tablo 2.6). Birim alan verimi buğday ve arpanın yaklaşık iki katıdır. Gelişmekte olan Asya ülkelerinde buğday ve çeltikten sonra üçüncü sırada bulunan mısır, özellikle Latin Amerika ve Afrika'da birinci sırada yer almaktadır.

Ülkemizde hayvan yemi ve insan gıdası olarak çok farklı alanlarda kullanılan mısır, ekim alanı ve üretim miktarı ile buğday ve arpadan sonra en fazla üretilen önemli bir bitkidir (Tablo 2.7).

Tablo 2.6: Önemli tahılların dünyadaki ekim alanları, üretim ve verim miktarları (FAO, 2007)

TAHILLAR	**Ekim Alanı (bin ha)**	**Üretim (bin ton)**	**Verim (ton/ha)**
Mısır	157.874	784.786	4.97
Buğday	217.432	607.045	2.79
Çeltik	156.952	651.742	4.15
Arpa	56.608	136.209	2.40

Tablo 2.7: Türkiye'de önemli tahılların üretim miktarları (FAO, 2011)

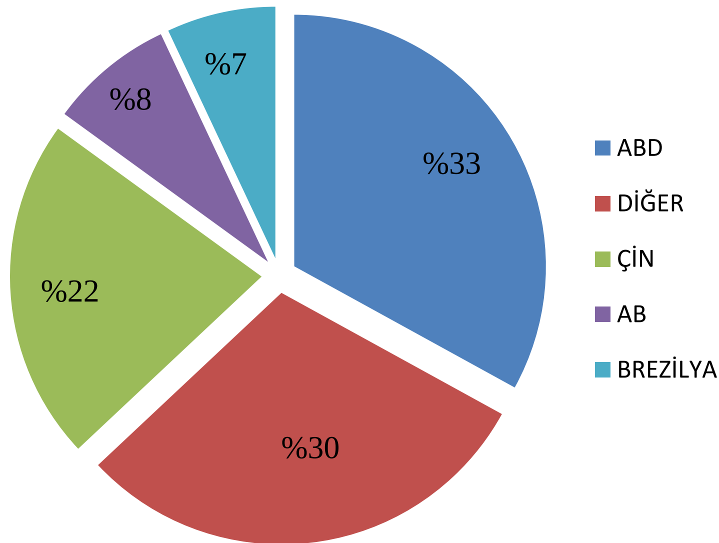
TAHILLAR	2006-2010 ortalaması (bin ton)	2010 (bin ton)	2011 (bin ton)	2011/2010 değişimi (%)
Buğday	19.059	19.660	21.800	11
Arpa	7.464	7.240	7.600	5
Mısır	4.036	4.310	4.200	- 3
Diğerleri	1.340	1.530	1.604	5
Toplam	**31.899**	**32.740**	**35.204**	8

Mısırın çok sayıda kullanım alanı olup, farklı kısımları ayrı bir ekonomik değere sahiptir. Günümüzde mısırın doğrudan veya dolaylı olarak üretimine katıldığı 4.000 civarında farklı ürün vardır. Mısırın gıda olarak başlıca kullanım alanları; taze olarak tüketim (haşlama ve közleme), konserve, mısır unu, nişasta, mısır gevreği, cips, mısır turşusu, çerez, yağ, bebek mamaları, çikolata ürünleri, ciklet, şekerleme, tatlandırıcı, salata sosları, yüksek fruktozlu mısır şurubu olarak sıralanabilir. Ayrıca mısır bitkisi hayvan yemi olarakta geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bu önemli iki kullanım alanı dışında benzine katkı maddesi olarak etanolün üretiminde ve otomotiv sanayi, temizlik malzemeleri, tekstil ve kozmetik sanayinde de mısır bitkisinden yararlanılmaktadır. Tahmini olarak dünya mısır üretiminin %60'ı hayvan yemi, %20'si insan gıdası (doğrudan tüketim), %10'u işlenmiş gıda ve %10'u diğer tüketimler (tekstil ve kozmatik sanayi, temizlik malzemeleri, etanol üretimi, otomotiv sanayi) ile tohumluk olarak kullanılmaktadır (Özcan, 2009). Mısırın besin değeri Tablo 2.8'de kısaca özetlenmiştir.

Tablo 2.8: Mısır tanesinin kimyasal özellikleri (White ve Johnson, 2003)

Özellikler	Miktar Aralığı (%)
Su (tohumda)	7-23
Nişasta	61-78
Protein	6-12
Yağ	3,1-5,7
Mineral madde	1,1-3,9
Pentozanlar	*5,8-6,6*
Lif	8,3-11,9
Selüloz + Lignin	3,3-4,3
Şekerler (glikoz olarak)	1,0-3,0
Toplam Karotenler	12-36

Hayvansal üretimin en önemli girdilerinin başında yem gelmektedir ve farklı hayvan türlerine göre değişmekle birlikte hayvancılık işletmelerindeki toplam giderlerin % 50-80’ini yem giderleri oluşturmaktadır. Bunun da yarıdan fazlasını hatta tavukçulukta tamamını karma yemler oluşturmaktadır. Çiftlik hayvanlarının çok miktarda ve yüksek kalitede ürün vermelerini sağlamak üzere, verileceği hayvanın ihtiyaçları ölçüsünde besin madde içeriği dengelenmiş, birden fazla yem hammaddesinin bir araya getirildiği, özel teknoloji kullanılarak endüstriyel boyutta üretilmiş yem karışımlarına “karma yem” denir. Hayvancılık endüstrisine hizmet veren karma yem endüstrisinin temel hammadde kaynaklarının en önemlileri bitkisel ürünlerdir. Mısır da karma yem endüstrisinin en önemli hammadde kaynaklarındandır. Özellikle kanatlı rasyonlarında karma yemin yapısını %60–70 civarında buğday, arpa ve mısır gibi tane yemler ile protein kaynağı olarak soya küspesi oluşturmaktadır. Kanatlılar için karma yem üretiminde temel enerji kaynağı mısır, temel protein kaynağı soya ve türevleri iken, ruminantlar için karma yem üretiminde temel enerji kaynağı arpa ve mısır, temel protein kaynağı ise DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles)’dir.



Şekil 2.9: Mısırın hayvan yemi olarak kullanımının dağılımı (2001-2005)

2.5. TRANSGENİK MISIRLAR

Çiftçiler tarafından seleksiyon yolu ile çeşitli özellikleri geliştirilen mısırın, klasik ıslah yöntemleriyle değiştirilmesi mümkün olmayan pek çok özelliği, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak değiştirilebilir hale gelmiştir. Geçtiğimiz yıllarda bu teknolojinin üstünlüğü böceklere dayanıklı ve herbisitlere toleranslı mısır çeşitlerinin geliştirilmesiyle kanıtlanmıştır (Hamaker ve Larkins, 2002). 1990'da ilk transgenik mısırın geliştirildiği bildirilmiştir (Gordon-Kamm ve diğ., 1990). Ayrıca böceklere dirençli mısır ilk başarılı transgenik bitkilerdendir (Armstrong ve diğ., 1995). *Agrobacterium tumafaciens*'in mısır bitkisine gen aktarımında başarısız olması (Graves ve Goldman, 1986; Golovkin ve diğ., 1993) nedeniyle mısır bitkisine gen aktarımında pek çok doğrudan gen aktarım tekniği kullanılmıştır. Partikül bombardımanı tekniği ile embriyonik hücrelere gen aktarımı, birçok mısırın transgenik üretiminde kullanılarak başarılı olunmuştur. Tablo 2.9'da Avrupa Birliği tarafından onaylanan genetiği değiştirilmiş mısırlar gösterilmiştir.

Tablo 2.9: Avrupa Birliğince Onaylanmış Genetiği Değiştirilmiş Mısırlar

Transgenik çeşidi	**Üretici**	***Aktarılan gen***	**Onayın başadığı tarih**	**Onayın sona erdiği tarih**
Bt11	Syngenta	*cryIAb, bar*	28/07/2010	27/07/2020
GA21	Syngenta	*m_epsps*	28/03/2008	27/03/2018
MON810	Monsanto	*cry1Ab*		
MON863	Monsanto	*cry3Bb1, nptII*	13/01/2006 (gıdalar için) 10/08/2005 (hayvan yemleri için)	12/01/2016 (gıda için) 09/08/2015 (hayvan yemleri için)
NK603	Monsanto	*cp4_epsps*	03/03/2005 (gıda için) 19/07/2004 (hayvan yemleri için)	02/03/2015 (gıdalarda için) 17/10/2014 (hayvan yemleri için)
MON89034	Monsanto	*cry1A.105, cry2Ab2*	30/10/2009	29/10/2019
DAS59122	Pioneer, Dow AgroSiciences	*cry34Ab1 cry3Ab1, bar*	24/10/2007	23/10/2017

Tablo 2.9'un Devamı: Avrupa Birliğince Onaylanmış Genetiği Değiştirilmiş Mısırlar

Transgenik çeşidi	**Üretici**	***Aktarılan gen***	**Onayın başadığı tarih**	**Onayın sona erdiği tarih**
DAS1507	Pioneer ve Dow AgroSiciences	*cry1F, bar*	03/03/2006 (gıdalar için) 03/03/2006 (hayvan yemleri için)	02/03/2016 (gıdalar için) 15/03/2016 (hayvan yemleri için)
DAS1507x NK603	Pioneer ve Dow AgroSiciences	*cry1F, bar, cp4_epsps*	24/10/2007	23/10/2017
NK603x MON810	Monsanto	*cry1Ab, cp4_epsps*	24/10/2007	24/10/2007
MON88017	Monsanto	*cry3Bb1, cp4_epsps*	30/10/2009	29/10/2019
MIR604	Syngenta	*cry3A, pmi*	30/11/2009	29/11/2019
Bt11xGA21	Syngenta	*cry1Ab, bar, m_epsps*	28/07/2010	27/07/2020
MON88017x MON810	Monsanto	*cry1Ab, Cry3Bb1, c4_epsps*	28/07/2010	27/07/2020
MON863x NK603	Monsanto	*Cry3Bb1, c4_epsps, nptII*	02/03/2010	01/03/2020
59122x1507x NK603	Pioneer Hi-Bred	*Cry1F, cry34Ab1, cry35Ab1, c4_epsps*	28/07/2010	27/07/2020
MON88017x MON810	Monsanto	*cry1Ab, Cry3Bb1, c4_epsps*	28/07/2010	27/07/2020
MON863x MON810	Monsanto	*Cry3Bb1, cry1Ab, nptII*	02/03/2010	01/03/2020
MON863x MON810x NK603	Monsanto	*Cry3Bb1, cry1Ab, c4_epsps, nptII*	02/03/2010	01/03/2020
MON863x MON810x NK603	Monsanto	*Cry3Bb1, cry1Ab, c4_epsps, nptII*	02/03/2010	01/03/2020

1507x59122	Dow AgroSicience/ Pioneer Hi-Bred	*Cry1F, cry34Ab1, cry35Ab1, bar*	28/07/2010	27/07/2020
MON89034x NK603	Monsanto	*Cry1A.105, cry2Ab2, c4_epsps*	28/07/2010	27/07/2020
59122 x NK603	Pioneer Hi-Bred	*cry34Ab1 cry3Ab1, bar cp4_epsps*	30/10/2009	29/10/2019

Transgenik mısırların dünyanın pek çok yerinde gıda olarak kullanılmasına izin verilmektedir. Genetiği değiştirilmiş mısırlar gıda maddesi olarak kullanılması dışında hayvan yemi olarak da kullanım alanı bulmaktadır. Transgenik hayvan yemi üretimini artırmaya yönelik çalışmalarda; daha kısa sürede, daha yüksek kalitede ve daha fazla miktarda ürüne ulaşmak amaçlanmıştır (Ergun *ve ark.*, 2004). Tablo 2.10'da Tarım, Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı Biyogüvenlik Kurulunca onaylanmış, yemlerde kullanılmasına izin verilen mısır çeşitleri gösterilmiştir.

Tablo 2.10: Biyogüvenlik Kurulunca yemlerde kullanılması onaylanmış mısır çeşitleri (17 Kasım 2011)

Event	Böcek Direnç Geni	Etki Ettiği Böcek Takımları	Herbisit Tolerans Geni	Etki Ettiği Herbisitler
Bt11	cry1Ab	Lepidoptera	Pat	Glifosinat
DAS1507	cry1F	Lepidoptera	Pat	Glifosinat
DAS59122	cry34Ab	Coleoptera	Pat	Glifosinat
DAS1507×NK603	cry1F	Lepidoptera	Pat cp4 epsps	Glifosinat Glifosat
NK603			Epsps	Glifosat
NK603×MON810	cry1Ab	Lepidoptera	Epsps	Glifosat
GA21			Epsps	Glifosat
MON89034	cry1A.105 cry2Ab2	Lepidoptera		
MON89034×NK603	cry1A.105 cry2Ab2	Lepidoptera	cp4 epsps	Glifosat
Bt11×GA21	cry1Ab	Lepidoptera	Pat Mepsps	Glifosat Glifosinat
59122×1507×NK603	cry1F cry34Ab1 cry35Ab1	Lepidoptera Coleoptera	Pat cp4 epsps	Glifosat Glifosinat
1507×591220	cry1F cry34Ab1 cry35Ab1	Lepidoptera Coleoptera	Pat	Glifosinat
MON88017×MON810	cry3Bb1 cry1Ab	Lepidoptera Coleoptera	cp4 epsps	Glifosat

Son yıllarda hayvanların beslenmesinde, besin içerikleri (amino asit, protein, yağ, karbonhidrat) artırılmış ve besleyici olmayan faktörleri azaltılmış transgenik yem maddelerinin kullanılmasıyla hayvanların besi performanslarının iyileştirilmesi yönünde bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Doğrudan veya yan ürünleri hayvan beslemede kullanılan transgenik ürünler içerisinde mısır, soya, kanola, pamuk, yonca, çeltik, şeker pancarı yer almaktadır. Tüm bu çeşitler içerisinde en büyük pay mısır, soya, pamuk ve kanola aittir.

Transgenik hayvan yemleriyle ilgili pek çok bilimsel çalışma yapılmıştır. Özellikle bu çalışmalar kanatlı hayvanlar üzerine yoğunlaşmıştır. Kanatlı hayvan beslemede transgenik yem maddelerinin kullanımıyla ilgili pek çok çalışmanın yapılmasının nedeni; bu hayvanlarda nesiller arası sürenin kısa olması ve metabolizmalarının hızlı olmasıdır. Çünkü kanatlı hayvanların karma yemlerinde transgenik yem maddelerinin kullanılmasından kaynaklanabilecek olumsuzluklar kısa sürede ortaya çıkabilmektedir. Kanatlı hayvan beslemede transgenik yem maddelerinin kullanılması durumunda besi performansı bakımından klasik yem maddeleriyle aralarında önemli bir farklılığın bulunmadığına ve bunun da söz konusu yem maddelerinin yapısındaki rekombinant DNA’nın hayvanların sindirim sisteminde parçalanmasından kaynaklandığına ilişkin veriler bulunmaktadır. Transgenik mısır veya soya içeren karma yemlerle beslenen kanatlı hayvanların dokularında hiçbir rekombinant DNA’nın bulunmadığına dair araştırma sonuçları bulunmakla beraber (Anon, 2001; Khumnirpetch ve ark. 2001), broyler ve yumurta tavuğu rasyonlarında transgenik yem maddelerinin kullanılması durumunda bu hayvanların karaciğer, dalak ve böbreklerinde transgenik DNA’nın bulunduğuna ancak yumurtada bulunmadığına dair bildirimler de bulunmaktadır (Einspanier ve ark. 2001; Klotz ve ark. 2002).

Hayvan beslemede özellikle de kanatlı hayvan beslemede kullanılan yem maddeleri bakımından ithalata bağlı olan Türkiye’de, transgenik yem maddelerini kullanmadan önce mutlaka bu ürünlerin insan ve hayvan sağlığı ile çevre üzerine etkilerinin incelenmesi gereklidir. Bunun yanı sıra gerekli yasal mevzuatlar oluşturularak

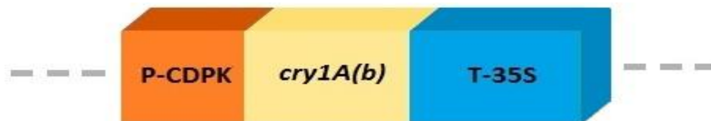
yemlerin besin maddesi içeriklerinin, yem değerlerinin ve gerçekten ekonomik olup olmadıklarının belirlenmesinden sonra kullanımlarına karar verilmelidir.

2.5.1. Bt176 Mısır Çeşidinin Özellikleri

Avrupa mısır kurduna (ECB) dirençli bir mısır hattı olarak geliştirilen Bt-176 transgenik mısır çeşidi, embriyolara mikroprojektil bombardıman ve rekombinant DNA teknolojisi yolu ile, doğada bulunan *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*'den izole edilen insektisid *CRYIA(b)* proteinini şifreleyen *cryIA(b)* geninin aktarılması ile geliştirilmiştir. Mısırdaki anlatımını arttırabilmek için sentetik olarak geliştirilen bu gen doğal olanına % 65 homoloji göstermektedir. Şifrelediği *CRYIA(b)* proteini, ECB'ninde dahil olduğu *Lepidoptera* takımına ait bazı kelebek ve güve türlerine karşı aktiftir. Ayrıca bu proteinin insanlara, diğer omurgalılara ve yararlı böceklere toksik olmadığı gösterilmiştir (Lee ve ark., 1995).

Event Bt-176 iki ayrı sentetik *cryIA(b)* gen kasetlerini taşıyan bir vektörün transformasyonu ile elde edilmiştir. Kasetlerinin birinde *cryIA(b)* geni sadece yeşil dokularda anlatım yapar ve (P-PEPC) promotorunun transkripsiyonel kontrolü altındadır. İkinci gen kasedinde aynı gen protein kinaz promotoru (P-CDPK) kontrolü altındadır.

Bunun yanı sıra bu mısır hattına ikinci bir transformasyonla, genetik olarak değişikliğe uğratılmış bitkileri çok erken gelişme dönemlerinde seçip ayrıştırabilmek için glufosinat amonyum herbisitine direnç sağlayan bir başka gen de (*bar* geni) aktarılmıştır (Querci ve Mazzara, 2004). Bu iki farklı transformasyon sonucunda aktarılmış olan *bar* ve *cryIA(b)*genleri ve onların kontrol dizilerinin şematik gösterimi Şekil 2.10'da birlikte verilmiştir.



Şekil 2.10 : Bt176 *cry1A(b)* gen kasedinin şematik gösterimi



Şekil 2.11 : Bt176 *bar* gen kasedinin şematik gösterimi

2.5.2. Roundup Ready Soya Çeşidinin Özellikleri

Soya hattı GTS, 40-3-2 Monsanto Kanada şirketi tarafından soya üretiminde zararlı bitkilerle mücadele de alternatif bir sistem olarak glufosatın kullanımına olanak sağlamak için geliştirilmiştir. GTS 40-3-2'nin geliştirilmesi, *Agrobacterium tumafaciens* suşu CP4'den izole edilen glufosat dirençli 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enzimini şifreleyen genin, ticari soya çeşidi A5403'e aktarılması yolu ile olmuştur. Şekil 2.11'de GTS 40-3-2 soya çeşidine ait gen kasedi gösterilmiştir.



Şekil 2.12 : GTS 40-3-2 gen kasedinin şematik gösterimi P-35S: Karnabahar mozaik virüsünün 35S promotoru, CTP4: Petunia hibrida kaynaklı kloroplast transit peptidi, CP4 EPSPS: Agrobacterium tumefaciens CP4 suşundan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geni, T-nos: Agrobacterium tumefaciens kaynaklı NOS terminatörü (Querci, 2006)

2.6. BİYOGÜVENLİK

GDO'ların kullanımının yaygınlaşmasına paralel olarak bu ürünlerin doğal çevreye karşı risklerini gösteren kanıtlarda artış gözlenmektedir. Bu durum, sözü edilen ürünlerin olası ekolojik risklerine, insan ve hayvan sağlığına olumsuz etkilerine karşı bir biyogüvenlik sisteminin uygulanmasını kaçınılmaz hale getirmektedir.

Biyogüvenlik devlet planlama teşkilatı tarafından ‘‘Modern biyoteknoloji tekniklerinin, uygulamalarının ve modern biyoteknoloji ürünlerinin insan sağlığı ve biyolojik çeşitlilik üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin belirlenmesi sürecini (risk değerlendirme) ve belirlenen risklerin meydana gelme olasılığının ortadan kaldırılması ya da meydana gelme durumunda oluşacak zararların kontrol altında tutulması için (risk yönetimi) alınan tedbirleri kapsayan bir kavram’’ olarak

tanımlanmaktadır (DPT, 2000). Biyogüvenlik tedbirleri bilimin önünü kesmeden, insan sağlığı, sosyal yapı ve biyolojik çeşitlilik üzerinde oluşacak olumsuzlukları önceden belirleyerek, tedbir alma yolundaki kurumsal ve idari sistemleri gerektirmektedir. Bu bağlamda, biyogüvenlik, hukuki düzenlemeler ve bilgi paylaşımı dahil, değerlendirme-izleme-kontrol mekanizmalarını kapsayan kurumsal yapılanma olarak ele alınabilir (DPT: 2515, Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı: Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Özel İhtisas Komisyonu Raporu, 2000).

AB'de, GDO'ların çevreye kasıtlı salımına ilişkin ana hükümler, 90/220/EEC sayılı ve 23 Nisan 1990 tarihli Konsey yönetmeliğiyle belirlenmiş, ancak daha sonra yeni gelişmeler ışığında düzenlenerek, 2001/18/EC sayılı ve 12 Mart 2001 tarihli Konsey yönetmeliğine dönüştürülmüştür. GDO içeren ürünlerin pazara sürülmesine yönelik düzenlemeler ise, birliğin 93/572/EEC sayı ve 19 Ocak 1993 tarihli, 97/258/EEC sayı ve 27 Ocak 1997 tarihli yönetmelikleriyle yapılmıştır (Avrupa Birliği'nde ve Türkiye'de Çevre Mevzuatı, Türkiye Çevre Vakfı Yayını, 2001). Ayrıca EC 1829/2003 ve 1830/2003 yönetmelikleri GDO'ların piyasaya sürülmesini ve etiketlenmesini düzenlemektedir. Bu düzenlemelere göre ürünün ancak % 0.9'un üzerinde bir değerde GDO içermesi durumunda etiketlenmesi gerekmektedir.

Avrupa Birliği'ne üye ve aday devletler, *"Cartagena Protokolü"* olarak bilinen Biyolojik Çeşitlilik Anlaşması Biyogüvenlik Protokolü'nü kabul etmiş durumdadır. Dünyada 29 Ocak 2000 tarihinde Fransa da kabul edilen ve 11 Eylül 2003 tarihinde yürürlüğe giren Cartagena Biyogüvenlik Protokolü, BM Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesine ek protokol olarak hazırlanmış ve yürürlüğe girmiştir. Bu protokolün amacı, insan sağlığı üzerindeki riskler de göz önünde bulundurularak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir kullanımı üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilecek olan tüm değiştirilmiş canlı organizmaların sınır ötesi hareketi, transit geçişi, muamelesi ve kullanılması hakkında yeterli bir koruma düzeyinin sağlanmasına katkıda bulunmaktır.

Ülkemizde ise GDO ile ilgili yasal düzenlemeler son yıllarda oluşturulmuştur. Bu düzenlemeler sonucunda 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan ''Biyogüvenlik Kanunu'' yürürlüğe girmiştir. Bu kanunun amacı;

bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esasları belirlemektir. GDO ve ürünleri için yapılan başvurular ; İnsan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevre ve biyolojik çeşitliliği tehdit etmesi, üretici ve tüketicinin tercih hakkının ortadan kaldırılması, çevrenin ekolojik dengesinin ve ekosistemin bozulmasına neden olması, GDO ve ürünlerinin çevreye yayılma riskinin olması, biyolojik çeşitliliğin devamlılığını tehlikeye düşürmesi ve başvuru sahibinin biyogüvenliğin sağlanmasına yönelik tedbirleri uygulamak için yeterli teknik donanıma sahip olmadığının anlaşıldığı durumlarda reddedilir. Herhangi bir ürünün Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenen eşik değerin üzerinde (% 0.9) GDO ve ürünlerini içermesi halinde; etikette, GDO içerdiğinin açıkça belirtilmesi zorunludur (Resmi Gazete, 2010).

Ayrıca, biyogüvenlik kanununun esaslarına göre ülkemizde GDO ve ürünlerinin onay alınmaksızın piyasaya sürülmesi, GDO ve ürünlerinin, kurul kararlarına aykırı olarak kullanılması veya kullandırılması, genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı, GDO ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması da yasaklanmıştır (Resmi Gazete, 2010).

2.7. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN TANISI

Genetiği değiştirilmiş bitkilerden elde edilen ham materyal ve işlenmiş ürünler, aktarılan genin DNA dizisinin veya bu gen tarafından şifrelenen yeni proteinlerin saptanması ile tanımlanabilir. GDO tanısı kalitatif (var/yok analizleri) ve kantitatif (miktar analizleri) analizlerle yapılabilmektedir.

Proteine dayalı yaklaşımda, araştırılan proteine karşı geliştirilmiş özel antikorlar kullanılır. Protein temelli immünokimyasal testlerden en yaygın kullanım alanına sahip olan ELISA yönteminde özel bir proteine bağlanması için bir antikor ve ilgilenilen protein standardı ile karşılaştırılarak, reaksiyonun sonucunu bir renk ürünü olarak ölçülebilen, antikora bağlı bir enzim kullanılır. Alternatif protein temelli yöntemler LFS'ler (Lateral Flow Strips), immunomagnetik elektrokimyasal sensörler, 2-boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrofotometresi kullanımını içermektedir. Proteine dayalı yöntemler, ölçülebilir miktarda protein üretildiğinde pratik ve etkili bir analiz yöntemidir. Ancak genetik olarak değiştirilmiş ürünler yanlızca bazı gelişim safhalarında veya bitkilerin belirli bölümlerinde üretilirler ve bunları kolayca ölçmek mümkün olmayabilir (Querci, 2004). Ayrıca proteine dayalı yöntemler ile aynı protein özelliğini gösteren farklı transgenik vakalar arasındaki fark ayırt edilemeyebilir. Buna ek olarak, özellikle endüstriyel işlemler proteinlerin kolayca bozulmasına neden olarak işlenmiş ürünlerde bu yöntemlerin kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Elenis ve diğ., 2008).

2.7.1. DNA İzolasyonu

Geniş kullanım alanı, özgünlüğü, yüksek verimi ve hızı dolayısıyla protein temelli yöntemlere göre daha yaygın olarak kullanılan DNA temelli yöntemler genel hatlarıyla; DNA izolasyonu, çeşitli PCR yöntemlerine dayalı tarama, tanımlama ve miktar tayini aşamalarından oluşur.

Nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması çoğu moleküler biyolojik çalışmada ve rekombinat DNA tekniklerinin tümünde ilk adımıdır. Nükleik asitlerin kalitesi ve saflığı PCR analizleri için önemli faktörlerden biridir. Yüksek saflıkta, inhibisyona yol açan maddelerden arındırılmış nükleik asitleri elde etmek için, uygun ekstraksiyon yöntemleri uygulanmalıdır. Örnekteki PCR inhibitörlerinden kaynaklanabilecek yanlış (negatif) bir sonucun ortaya çıkmasını önlemek için PCR inhibisyonu test edilerek kontrollü bir deney gerçekleştirilmesi önemlidir (Somma, 2006). Bazı PCR inhibitörleri ve inhibisyon konsantrasyonları Tablo 2.11'de gösterilmiştir.

Tablo 2.11. PCR inhibitörleri ve inhibisyon konsantrasyonları

PCR inhibitörü	**Miktar**
SDS	> % 0.005
Fenol	> % 0.2
Etanol	> % 1
İzopropanol	> % 1
Sodyum asetat	> 5 Mm
Sodyum klorür	> 25 mM
EDTA	> 0.5 mM
Hemoglobin	> 1 mg/ml
Heparin	> 0.15 i.u./ml
Üre	> 20 mM

Biyolojik materyalden DNA ekstraksiyonu hücrelerin parçalanması, nükleazların inaktivasyonu ve DNA dışındaki nükleik asitlerin elimine edilmesiyle birlikte DNA'nın parçalanmış hücreden ayrımını gerektirir. Hücreleri parçalama işlemi mekanik parçalama (öğütme gibi), kimyasal uygulama (deterjanlarla parçalama gibi) ve enzimatik parçalama yöntemlerinden bir veya birkaçı kullanılarak gerçekleştirilebilir (Somma, 2006). Hücre ekstrelerinden nükleik asitlerin saflaştırılmasında kullanılabilecek yöntemler ekstraksiyon (kloroform, fenol), çöktürme (izopropanol, etanol), santrifügasyon, afinite kolon kromotografisi olarak sıralanabilir (Zimmermann ve ark., 1998).

İlk kez Murray ve Thompson tarafından 1980'de geliştirilen CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) yöntemi modifiye edilerek bitki ve bitki kaynaklı gıda ve yem maddelerinden DNA ekstraksiyonu ve purifikasyonu için kullanılan etkin bir yöntem haline getirilmiştir. Yöntem özellikle çeşitli bileşenlerin (polisakkarit ve polifenolik bileşenler) elimine edilmesinde ve böylelikle saf DNA eldesinde etkilidir (Somma, 2006).

Teknik birkaç değişiklikle birçok ham ve işlenmiş gıda ve yem matriksinde kullanılabilmesi için geliştirilmiştir (Meyer ve ark., 1997; Hupper ve ark., 1998; Hotzel ve ark., 1999).

Bitki hücreleri, düşük tuz konsantrasyonunda nükleik asitlerle çözünmez bir kompleks oluşturan iyonik deterjan "setiltrimetilamonyum bromür" (CTAB) ile parçalanabilirler. Bu koşullar altında polisakkaritler, fenolik bileşenler, ve diğer kontaminantlar üst fazda kalır, böylece uzaklaştırılabilirler. DNA kompleksi tuz konsantrasyonunun arttırılmasıyla çözülür ve DNA etanol veya izopropanol ile çöktürülür. Bu üç temel aşamanın prensibi, hücre membranının parçalanması, genomik DNA'nın ekstraksiyonu ve çöktürülmesi olarak tanımlanabilir (Somma, 2006). Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (EURL-GMFF), mısır ve soya gibi pek çok tür için CTAB metodunun uygulanabilirliğini onaylamıştır (CRL-GMFF, 2007, 2008). DNA izolasyonundan sonraki adımlar, incelenen örneklerin yabancı gen içerip içermediklerini, eğer içeriyorlarsa bu yabancı genin hangi çeşit GDO'ya ait olduğunu ve miktarının kesin olarak belirlenmesini sağlayan yöntemlerden oluşmaktadır.

2.7.2. DNA Temelli Analiz Yöntemleri

DNA temelli GDO analiz prosedürleri PCR'a dayalı tarama, tanımlama ve miktar tayini olmak üzere üç aşamadan oluşur.

Tarama : Tarımsal ürün ve gıda DNA'sının bileşimi hakkındaki ilk bilgiye ulaşabilmek için gerçekleştirilir (Anklam et.al, 2001). Taramanın amacı örneğin yabancı gen içerip içermediğini belirlemektir. Bu amaç için pozitif ya da negatif olarak sonuçlanan tarama metodu kullanılabilir. Tarama metodu genellikle PCR'a dayalıdır. GD bitkilerin çoğunluğu CaMV 35S promotor ya da *Agrobacterium tumafaciens* NOS terminatör içeren dizilerle transforme edilmişlerdir. Yaygın olarak kullanılan klonlama vektörleri ise kanamisin antibiyotiğine direnç geni (KanR) içeren plazmidlerdir. Sonuç olarak, PCR metodları GDO taraması için geniş uygulamalara sahip T-NOS, P-35S, T-35S, nptII dizilerini hedef alır (Holst-Jensen ve diğ., 2003).

Tanımlama : Eğer tarama sonrası pozitif sonuç ile karşılaşılırsa, hangi çeşit GDO olduğunu anlamak ve böylece yetkililerce onaylanıp onaylanmadığını belirleyebilmek için daha ileri analizler gereklidir. Tanımlama incelenen örnekte kaç farklı GDO'nun var olduğunu ve bu GDO'ların AB ya da diğer ülkelerin kendi

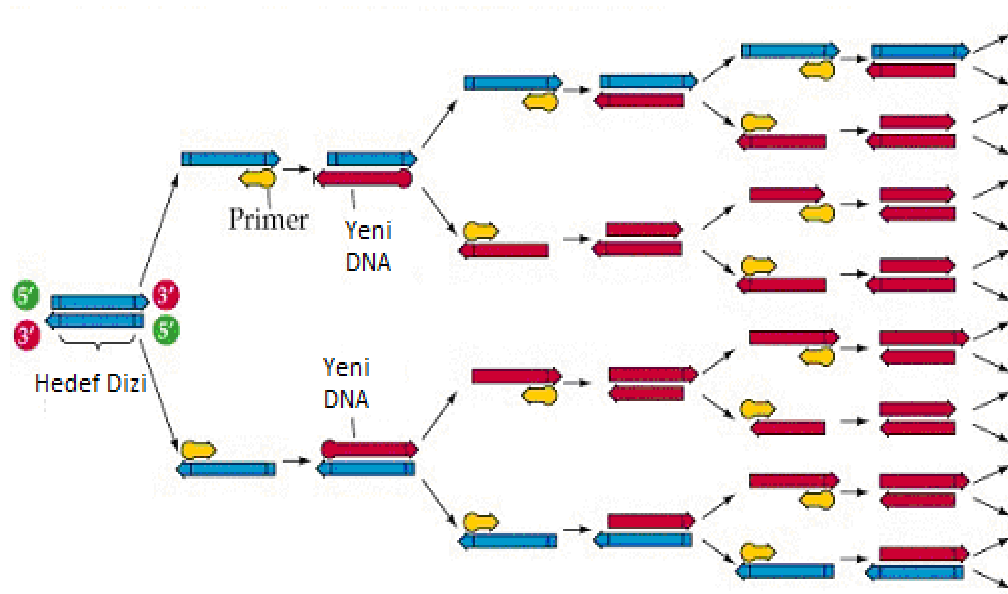
yönetmelikleri göz önüne alınarak onaylanıp onaylanmadığını ortaya koyar. GDO'ların tanımlanması öncesinde gerekli olan, onların moleküler düzeni hakkındaki ayrıntılı bilginin varlığıdır (Holst-Jensen ve diğ., 2003).

Miktar Tayini: Eğer ürünlerin GDO içerdiği belirlenirse, daha sonraki adım örnekteki mevcut yabancı genlerin her birinin kesin miktarının belirlenmesi ile bunun eşik değerine uygunluğunun tayin edilmesidir (Holst-Jensen ve diğ., 2003, Anklam ve diğ., 2001). Tipik olarak miktar tayininde kompetitif PCR ya da Real Time PCR uygulanır.

2.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

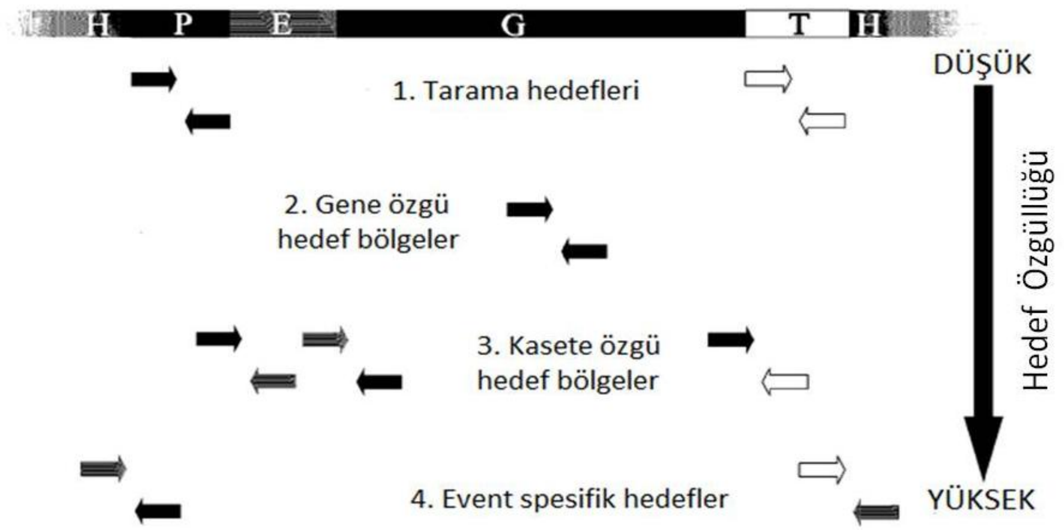
1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından bulunan PCR, bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir metottur. Bu teknik ile iki primer (hedef dizinin her iki ucuna tamamlayıcı sentetik oligonükleotidler) arasındaki hedef DNA parçası sıcaklık döngüleri boyunca DNA polimeraz enzimiyle çoğaltılır (Şekil 2.12). Günümüzde, PCR kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopyaya ulaşılabilir.

PCR metodunda bir döngü, kalıp DNA'nın denatürasyonu, primer bağlanması ve primer uzaması aşamalarından oluşur. Döngüler boyunca hedef dizinin sayısı üssel olarak artar. İlk aşamada kalıp çift zincir DNA denatürasyon sıcaklığına (~94 ºC) ısıtılarak tek zincir haline getirilir. İkinci aşamada, primerlerin hedef dizilere bağlanması için sıcaklık 50-65 ºC' ye (GC içeriğine göre değişken) düşürülür. Üçüncü aşamada ise hedef diziye bağlanmış primerler optimum sıcaklıkta (72 ºC) genellikle *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraz enzimi tarafından uzatılır. Primerlerin 5' → 3' yönünde kalıp DNA'ya uygun olarak uzatılmasıyla hedef dizinin kopyası oluşturulmuş olur (Somma, 2006).



Şekil 2.13: PCR Mekanizması

Şekil 2.13'te PCR'a dayalı analizlerin artan özgüllüğe göre sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.14: Gen kasetinin şematik gösterimi ve PCR'a dayalı analizlerin artan özgüllüğe göre sınıflandırılması

H: Konakçının genomik DNA'sı, P: Promotor element, E: Enhancer element, G: İlgili gen, T: Terminatör

2.7.3.1.*Tarama Amaçlı Kalitatif PCR*

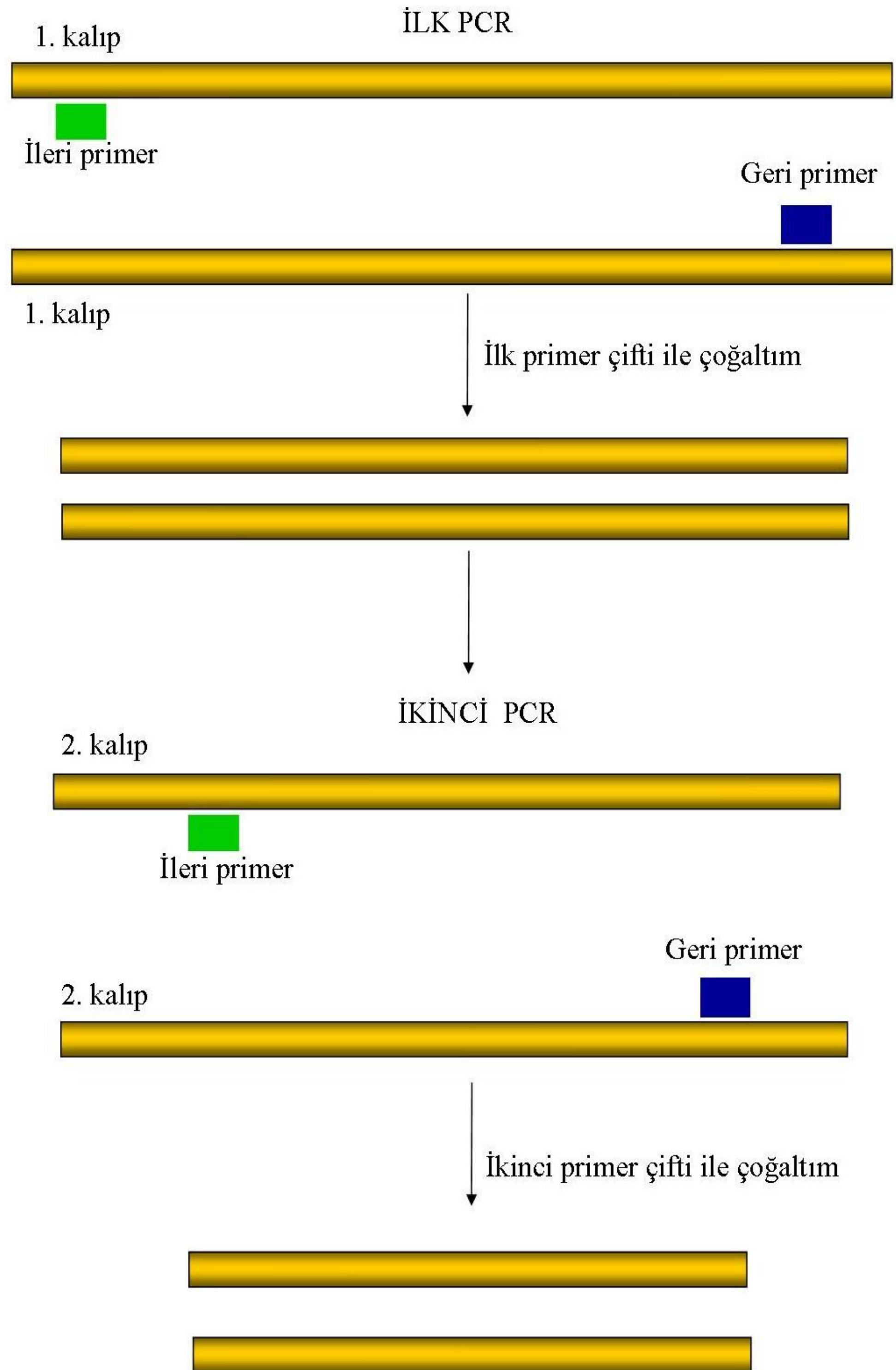
Bitkiye Özgü Kalitatif PCR: Bitkiye özgü PCR, total DNA içinde GDO analizi yapılacak bitki DNA'sının var olup olmadığının belirlenebilmesi için gereklidir. Kullanılan hedef gen dizisi yalnızca hedef bitki türüne özgü olmalıdır. *Zein, ıtp, maize-ppi-PPF, zSSIIb, Ivr1, hmga, Adh1* genleri mısır bitkisini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan hedef dizilerdir. Lektin geni ise soya bitkisini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan hedef dizidir (GMDD, 2012).

Yabancı Gene Özgü Kalitatif PCR: Bitki kaynaklı gıda ve yemlerde, herhangi bir yabancı genin tanımlanması, tarama yöntemi olarak adlandırılan bir yaklaşımla analiz edilen örnekte 35S promotor ve/veya nos terminatörün varlığının PCR ile belirlenmesi ile gerçekleştirilir. Bugüne dek onay almış genetiği değiştirilmiş bitkilerin hemen hepsinde 35S promotor ve nos terminatörün düzenleyici diziler olarak kullanımı transgen içeren gıda ve yem maddelerinin belirlenmesini sağlamaktadır (Hemmer, 1997).

Son olarak, geleneksel PCR'da elde edilen PCR ürünlerinin analizi için örnekler agaroz jel elektroforez sistemi ile görüntülenir. Agaroz jel elektroforezinde, jele yüklenen örnekler, jelin içinde büyüklüklerine göre ayrılır ve analiz edilebilir (Elenis ve diğ., 2008).

2.7.3.2. Nested PCR

Yuvalanmış (''nested'') PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükteki bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde ardarda iki PCR yapılır. İlk PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. İkinci PCR ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren ''nested'' primerleri ile yapılır. İlk PCR ürünleri ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilir. Böylece ''nested'' PCR doğru ürünlerin çoğaltılması için kullanılır (Şekil 2.14). Tablo 2.12'de özgüllüğüne göre gruplandırılmış GDO analiz yöntemlerinden bazı örnekler verilmiştir.

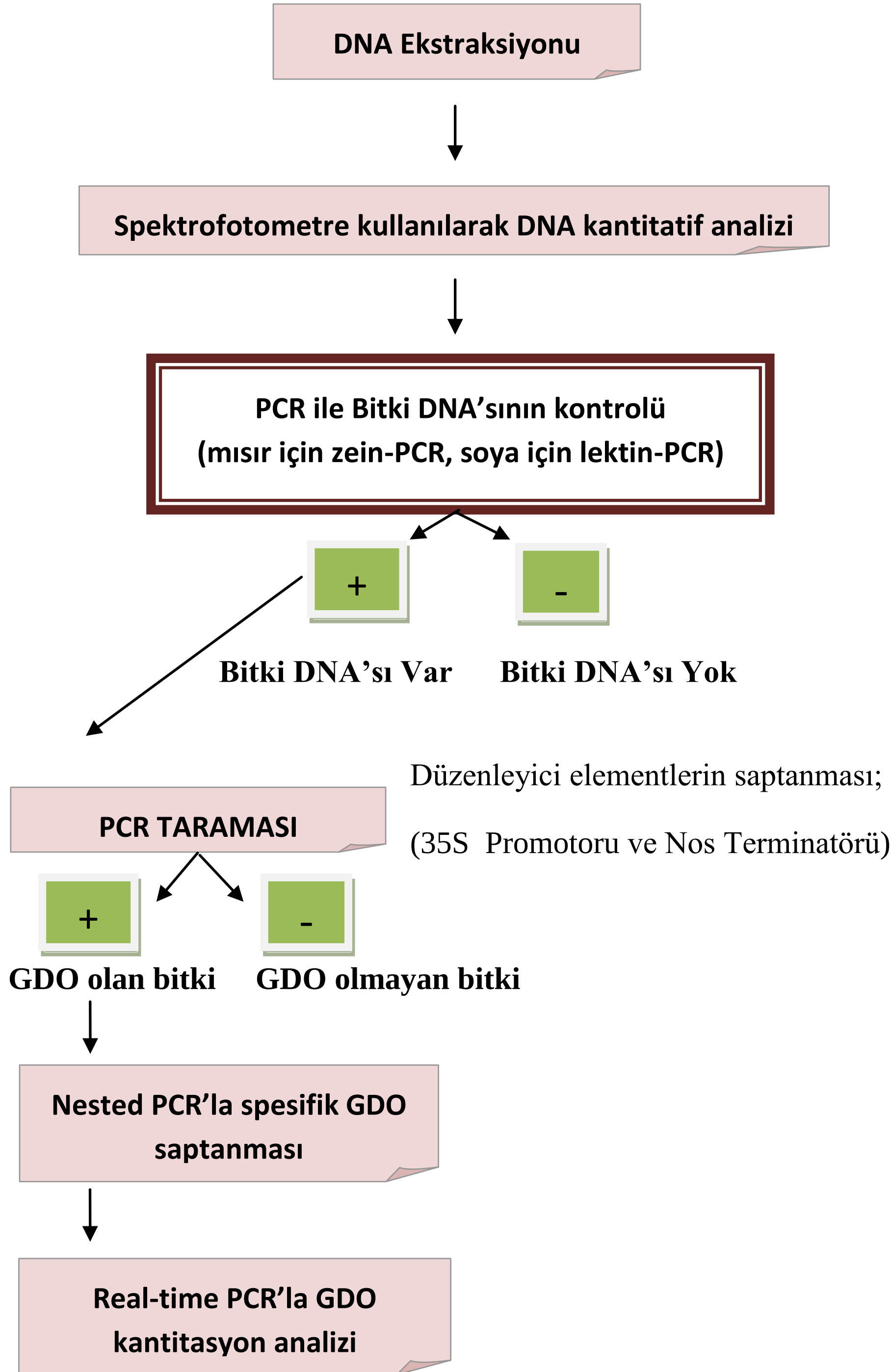


Şekil 2.15: Nested PCR

Tablo 2.12: Özgüllüğüne göre gruplandırılmış GDO analiz metodlarından örnekler

Kullanılan Metod Tipi	Hedef Dizi	Referans
Bitki kaynaklı DNA'nın belirlenmesi	Kloroplast tRNA gen intron	Tabarlet P. ve ark., 1991
Türe Özgü Belirleme Metodları	Mısır *Zein* geni, Soya *Lectin* geni, Domates poligalakturonaz geni	Zimmermann A. ve ark.,1998 Meyer R. ve ark., 1996 Busch U. ve ark., 1999
Tarama metodları	CaMV promotor (P-35S) CaMV teminatör (T-35S) *Agrobacterium tumafaciens* nopalin sentaz (T-Nos)	Pietsch K. ve ark., 1997 Matsuoka T. ve ark., 2002 Pietsch K. ve ark., 1997
	Neomisin-3-fosfotransferaz II (nptII) (Bitkide kanamisin direnci)	Matsuoka T. Ve ark., 2002
Gene Özgü Belirleme Metodları	*bar* (fosfinotrisin asetil transferaz) geni CryIA (b) geni (sentetik)	Ehlers B. ve ark., 1997 Ehlers B. ve ark., 1997
Gen Kasedine Özgü Metodlar	**Bt-11 Mısır**: IVS6-CryIA (b) geni	Matsuoka T. ve ark., 2001
	Bt-176 Mısır: CDPK promotor-sentetik CryIA (b)	Hupfer C. ve ark., 1998
	Ga21 Mısır: OTP-EPSPS geni (RoundupReady toleransı)	Matsuoka T. ve ark., 2001
	Mon802 Mısır: hsp 70 intron I-CP4-EPSPS geni	Matsuoka T. ve ark., 2002
	Mon810 Mısır: P-35S—hsp70 intron I; hsp 70 intron–CryIA(b) geni	Matsuoka T. ve ark., 2001
	40–3-2 (RoundupReady) soya: P-35S—CTP	Wurz A. ve ark., 1997
	T25 Mısır: *pat* (phospinotricin acetyltransferase) gene–T-35S	Matsuoka T. ve ark., 2001
	Zeneca Domates: T-Nos–domates poligalakturonaz geni	Busch U. ve ark., 1999
Event spesifik metodlar	Bt-11 Mısır, Mon810 Mısır, RoundupReady Soya	Zimmermann A. ve ark., 2000 Rønning SB. ve ark., 2003 Holck A. ve ark., 2002 Hernandez M. ve ark., 2002 Taverniers I. ve ark., 2001 Terry C. ve ark., 2001

Bu tez çalışmasında Şekil 2.15’te verilen akış şemasındaki yöntemler gıda ve yemlik mısır örneklerinde ‘‘Nested PCR ile spesifik GDO saptanması’’na, yem örneklerinde ise Real-time PCR’la GDO kantitasyon analizine kadar sırasıyla uygulandı. Ayrıca GDO (+) yemlerde CTP4-CP4 EPSPS gen kasedine özgü primerler kullanılarak PCR taraması yapıldı.



Şekil 2.16: GDO analizinde kullanılan yöntemlerin akış şeması (Querci ve diğ., 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÖRNEKLER

Bu tez kapsamında yapılan genetik analizlerde materyal olarak çeşitli yemlik mısır örnekleri, bu yemlik mısırlardan üretilmiş mısır içeren hayvan yemi örnekleri ve Türkiye pazarında satışı yapılan mısır içeren gıda örnekleri kullanıldı. Farklı işlenmişlik düzeylerine sahip gıda türleri ve markaları analiz edilmek üzere İstanbul'daki çeşitli marketlerden satın alındı. Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden elde edilen yemlik mısırlar ve mısır içeren hayvan yemleri Ankara Yem Sanayicileri Birliği'nden sağlandı. Kullanılan gıda, yemlik mısır ve bu yemlik mısırların ham madde olarak kullanılmasıyla üretilen hayvan yemi örnekleri Tablo 3.1'de listelendi.

Tablo: 3.1: Çalışmada Kullanılan Örnekler

Örnek No	Ürün
Örnek 1	Yemlik Mısır 1
Örnek 2	Yemlik Mısır 2
Örnek 3	Yemlik Mısır 3
Örnek 4	Yemlik Mısır 4
Örnek 5	Yemlik Mısır 5
Örnek 6	Yemlik Mısır 6
Örnek 7	Yemlik Mısır 7
Örnek 8	Yemlik Mısır 8
Örnek 9	Yemlik Mısır 9
Örnek 10	Yemlik Mısır 10
Örnek 11	Yemlik Mısır 11
Örnek 12	Yem 1
Örnek 13	Yem 2
Örnek 14	Yem 3
Örnek 15	Yem 4
Örnek 16	Yem 5

Tablo 3.1'in Devamı: Çalışmada Kullanılan Örnekler

Örnek No	Ürün
Örnek 17	Yem 6
Örnek 18	Yem 7
Örnek 19	Yem 8
Örnek 20	Yem 9
Örnek 21	Yem 10
Örnek 22	Yem 11
Örnek 23	Mısır Unu-1*
Örnek 24	Mısır Unu-2*
Örnek 25	Cin Mısır
Örnek 26	Mikro Dalga Cin Mısır
Örnek 27	Mısır Gevreği-1*
Örnek 28	Mısır Gevreği-2*
Örnek 29	Mısır Cipsi
Örnek 30	Bebek Maması-1*
Örnek 31	Bebek Maması-2*
Örnek 32	Bebek Maması-3*
Örnek 33	Tatlı Mısır-1*

*1, 2 ve 3 ifadeleri farklı markaları göstermektedir

3.2. DNA İZOLASYONU

Örneklerin tümünden ve kalitatif PCR analizlerinde kontrol grubu olarak kullanılan Sertifikalı Referans Materyallerden (ERM-BF412a, ERM-BF412b, ERM-BF412c, ERM-BF412d, ERM-BF412e, ERM-BF411a, ERM-BF411f) modifiye CTAB yöntemi (Somma, 2006) ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İşlemlerin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla DNA izolasyonu her örnek için üçer kez tekrar edildi. Olası bir kontaminasyonu engellemek üzere izolasyonda kullanılacak malzemeler ve çözeltiler (CTAB tamponu, CTAB çöktürme tamponu ve 1.2 M NaCl) 121ºC'de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlandı. Ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyon riskine karşı başka bir tüpe örnek yerine su koyularak (DNA içermeyen kontrol) işlem basamakları uygulandı ve bu şekilde DNA izolasyonunun kontrolü yapıldı.

3.2.1. CTAB Yöntemi İle DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, işlenmiş gıda, yem ve yemlik mısır örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirmek üzere modifiye edilmiş CTAB DNA izolasyon yöntemi (Somma, 2006) kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan örneklerden cin mısırı, tatlı mısır ve yemlik mısırlardan elde edilecek DNA miktarını artırmak amacıyla, mısır tanesindeki endosperm kısmı steril koşullar altında bistüri yardımı ile ayrılarak uzaklaştırıldı. Mısır gevreği, mısır cipsi ve hayvan yem örnekleri ise havanda dövülerek homojenize edildikten sonra işlem basamakları uygulandı. Diğer örneklere ise herhangi bir ön işlem yapılmadı.

Bu yöntemde kullanılan CTAB tamponu, CTAB çöktürme tamponu ve NaCl çözeltisinin içerikleri Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2: CTAB yöntemi ile DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
CTAB tamponu	20 g/l CTAB (Setiltrimetil amonyum bromür), 1.4 M NaCl (Sodyum klorür), 0.1 M Tris-HCl (Tris-Hidroklorür, Sigma, T5816) , 20 mM Na_2EDTA (Etilen daimin tetraasetik asit disodyum, Sigma, E5134)
CTAB çöktürme tamponu	5 g/l CTAB (Sigma, H5882), 0.04 M NaCl
NaCl	1.2 M NaCl (Riedel, D30926), distile su içinde

CTAB yöntemi ile DNA izolasyon prosedürü

100 mg gıda örneğine uygulanan homojenizasyon işleminden sonra elde edilen homojenat 1.5 ml'lik steril santrifrüj tüpüne aktarılır.

1. 300 µl dH_2O eklendi ve ters düz edilerek karıştırıldı.
2. 500 µl CTAB tamponu eklendi ve ters düz edilerek karıştırıldı.
3. 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma, P2308) eklendi, 65 ^oC'de 90 dakika inkübe edildi.
4. 20 µl RNaz A (10 mg/ml) (Sigma, R4642) eklendi, çalkalandı ve 65 ^oC'de 10 dakika inkübe edildi.

5. 16000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant 500 µl kloroform (Sigma, C2432) içeren santrifüj tüpüne transfer edildi ve 30 saniye çalkalandı.
7. 16000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi.
8. Üst fazın 500 µl'si 500 µl kloroform içeren santrifüj tüpüne aktarıldı ve çalkalandı.
9. 16000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. Üst faz temiz tüplere transfer edildi.
11. İki hacim (v/v) CTAB çöktürme solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı.
12. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
13. 16000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edildi.
14. Süpernatant atıldı.
15. Pellet 350 µl 1.2 M NaCl içersinde çözüldü.
16. 350 µl kloroform eklendi ve 30 saniye çalkalandı.
17. 16000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi.
18. Üst faz temiz tüplere transfer edildi.
19. 0.6 hacim (v/v) izopropanol (Sigma, I9516) eklendi ve çalkalandı.
20. 16000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edildi.
21. Süpernatant atıldı.
22. 500 µl %70'lik (v/v) etanol (Sigma, E7023) eklendi ve dikkatlice çalkalandı.
23. 16000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edildi.
24. Süpernatant atıldı.
25. Pellet kurutulduktan sonra 100 µl steril dH_2O içinde çözüldü.
   DNA çözeltisi -20 ºC'de saklandı.

3.3. DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ

İzole edilen DNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri için spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler kullanıldı.

3.3.1. Spektrofotometrik Analiz

Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların miktarının hesaplanması ve saflıklarının kontrol edilmesinde spektrofotometrik yöntem kullanıldı. DNA'ların miktar tayini, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre yapıldı. Çift iplikli DNA molekülüne ait 1 optik densite (OD) değeri 50 µg/ml'ye karşılık geldiği için DNA'ların konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplandı :

DNA (µg/ml) = A260 × sulandırım katsayısı × 50

Saflık kontrolü için ise DNA'nın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığını soğurma değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında ise genomik DNA'ların saf olduğu, değer aralığının dışında ise genomik DNA'ların saf olmadığı kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların kalitatif analizi % 1'lik, tarama amaçlı yapılan PCR'ların ürünleri ise % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanıldı. % 1'lik jel için 0.4 g, % 2'lik jel içinse 0.8 g agaroz (Sigma, A5073) tartılıp üzerine stok 50X TAE tamponunun (Tablo 3.3) sulandırılmasıyla hazırlanan, 40 ml 1X TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında 2 dakika süre ile çözündürüldü.

Oda sıcaklığında yaklaşık 60 ºC'ye kadar soğutulan jele son konsantrasyonu 0.5 ng/µl olacak şekilde 2 µl EtBr eklenip, karıştırıldı. Jel, tarağın yerleşmiş olduğu yatay elektroforez kasedine dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaşan agaroz jel, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 6 µl örnek, 1µl yükleme tamponu (Fermentas, R0611) ile karıştırıldıktan sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklenerek 70 V sabit akımda, ağırlık markırı (Fermantas Lambda DNA/EcoRI Hind III, SM0191 ve Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, SM0241) ile birlikte 45 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör (Vilber Lourmat, ECX-F26.M) ile görüntülendi.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
50X TAE Tamponu	2 M Tris bazı (Sigma, T8524), %0.0571 Glasiyal asetik asit (Sigma, A9967), 50 mM EDTA (pH 8.0)
10 mg/ml EtBr	10 mg EtBr, 1 ml distile su
6X Yükleme Tamponu	100 mM EDTA (Ph 8.0), %1 SDS, %60 Gliserol, %0.03 Bromofenol mavisi, %0.03 Ksilen siyanol FF

3.4. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ

Mısır içeren örneklerde yabancı genin varlığını analiz etmek amacıyla mısıra özgü zein geni (*Zein*), CaMV 35S promotoru ve NOS terminatörü kalitatif PCR'la belirlendi. İşlemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla her örnek için PCR üçer kez tekrar edildi ve her reaksiyon için pozitif, negatif ve kalıp içermeyen kontrol grupları kullanıldı. Kullanılan kontroller aşağıda açıklanmıştır.

Pozitif kontrol: DNA izolasyonunun ve PCR reaksiyonunun verimliliğini ölçmek için GDO olduğu ve içerdiği yabancı gen miktarı bilinen Sertifikalı Referans Materyallerden (% 0.1, %1, %2, %5 GD mısır) izole edilmiş DNA.

Negatif kontrol: Primer özgünlüğünü ve reaksiyon hassasiyetini ölçmek için hedef diziyi içermediği bilinen DNA'lar negatif kontrol olarak kullanıldı. Zein PCR'ı için arpadan (*Hordeum vulgare* L. Tokak varyetesi, Altınova Tarım İşletmeleri Müdürlüğü, Kadıhan/Konya) izole edilen DNA, 35S ve NOS PCR'ı için ise GDO içermediği bilinen Sertifikalı Referans Materyalden (% 0 GD mısır) izole edilmiş DNA.

Kalıp DNA içermeyen kontrol: Reaksiyon karışımının hazırlanması sırasında hedef nükleik asit dizisini taşıyan bir kontaminasyonun oluşması riskine karşı her PCR için kullanılan ve DNA içermeyen kontrol.

3.4.1. *Zein* Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

Mısır bitkisine özgü *zein* geni endospermde bulunan ve toplam proteinlerin %50 veya daha fazlasını oluşturan bir depo proteinini şifreler (Hamilton, 1951; Duvick, 1961). Mısır bitkisinin PCR'la tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mısır içeren örneklerden izole edilmiş DNA'da, mısır DNA'sının varlığından emin olmak için *zein* genine ait Zein_1-L ve Zein_1-R primerleri (Tablo 3.4) kullanılarak PCR yapıldı ve PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde (bkz. Bölüm 3.3.2) analiz edildi. Zein PCR'ı için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.5, kullanılan PCR programı ise Tablo 3.6'da verildi.

Tablo 3.4: Zein primerleri ve dizisi

Hedef	Primer	Nükleotid Dizisi (5′-3′)	Ürün boyutu (bç)
Zein Bölgesi	**Zein_1-L (ileri)** **Zein_1-R (geri)**	GCCATTGGGTACCATGAACC AGGCCAACAGTTGCTGCAG	104

Tablo 3.5: Zein PCR'ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.4	
10X PCR Tampon	2.5	1X
25 mM $MgCl_2$	2.5	2.5 Mm
10 mM Dntp	0.5	0.2 mM
10 µM ileri primer	0.5	0.20 µM
10 µM geri primer	0.5	0.20 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (50 ng)	2	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.6: Zein PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **"Uzama**	95 ºC 60 ºC 72 ºC	30 sn 30 sn 30 sn	30
Son uzama **Bekleme**	72 ºC 4 ºC	5 dk ∞	1

3.4.2. 35S Promotoru ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması

Genetiği değiştirilmiş ürünlerin çoğu Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promotor (P-35S) ve *A. tumefaciens* nopalin sentaz (T-Nos) terminatör dizilerini içeren plazmitlerle transforme edilmiştir (Holst-Jensen ve diğ., 2003). Bu nedenle bitki kökenli tohum, yem ve gıdalarda yabancı genlerin tarama yöntemiyle tanımlanmasında P-35S ve T-Nos yaygın olarak kullanılan hedef dizilerdir.

Mısır içeren ürünlerde yapılan bu tarama çalışmasında, 35S promotorunun saptanması için p35S-cf3/p35S-cr4, nos terminatörünün saptanması için ise Nos ter 2-5/Nos ter 2-3 primer çifti kullanıldı (Tablo 3.7). PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. 35S promotor bölgesi için gerçekleştirilen PCR sonucu agaroz jel elektroforezinde beklenen bant büyüklüğü 123 bç, nos terminatör bölgesi için ise 151 bç'dir. 35S ve nos PCR'ı için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.8 ve Tablo 3.10'da, kullanılan PCR programları ise Tablo 3.9 ve Tablo 3.11'de verildi.

Tablo 3.7: CaMV P35S ve *A. tumafaciens* nos primerleri ve dizileri

Hedef	Primer	Nükleotid Dizisi (5′-3′)	Ürün boyutu (bç)
35S promotor Bölgesi	**P35S-cf3** **P35S-cr4**	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	123
Nos terminatör Bölgesi	**tNOS 2-5′** **tNOS 2-3′**	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT	151

Tablo 3.8: Nos PCR'ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.7	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25 mM $MgCl_2$	2.5	2.5 Mm
2 mM dNTP	0.4	0.032 mM
10 µM ileri primer	0.4	0.16 µM
10 µM geri primer	0.4	0.16 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (50 ng)	2	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.9: Nos PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 ºC 61 ºC 72 ºC	30 sn 30 sn 30 sn	35
Son Uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	4 ºC	∞	

Tablo 3.10: CaMV P35S PCR'ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.9	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
2 mM dNTP	1	0.08 mM
10 µM ileri primer	0.5	0.2 µM
10 µM geri primer	0.5	0.2 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (100 ng)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.11: CaMV 35SPCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 ºC 60 ºC 72 ºC	30 sn 30 sn 30 sn	35
Son Uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	4 ºC	∞	

3.4.3. Bt176 Transgenik Mısır Çeşidini Belirlemeye Yönelik Nested PCR Analizleri

Bu aşamada, 35S promotor dizisini taşıdığı belirlenen örneklerin Bt176 transgenik mısır çeşidine ait olup olmadıklarının analizi için yem örneklerinin tümünden izole edilen DNA'lara Nested PCR yöntemi iki aşamalı olarak uygulandı. Nested PCR analizlerinde CRYIA1, CRYIA2, CRYIA3 ve CRYIA4 primerleri kullanıldı (Tablo 3.12). Nested 1 PCR döngüsü sonucunda PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde (bkz. Bölüm 3.3.2) analiz edilmesi ile pozitif örneklerde beklenen bant büyüklüğü 420 bç, Nested 2 PCR'ı için ise 189 bç.'dir. PCR reaksiyon koşulları Tablo 3.13'da ve Tablo 3.15'de PCR döngü koşulları ise Tablo 3.14'de ve Tablo 3.16'da verildi.

Tablo 3.12: Bt176'ya özgü Nested PCR primerleri

Hedef	Baz dizilimi 5'-3'	Ürün Uzunluğu
Bt176 **Cry1Ab**	**CRYIA1** 5' CGG CCC CGA GTT CAC CTT 3' **CRYIA2** 5' CTG CTG GGG ATG ATG TTG TTG 3' **CRYIA3** 5' CCG CAC CCT GAG CAG CAC 3' **CRYIA4** 5' GGT GGC ACG TTG TTG TTC TGA 3'	189

Tablo 3.13: B176 Nested 1 PCR'ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.7	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25mM $MgCl_2$	2.5	2.5 Mm
2 mM dNTP	1	0.08 Mm
10 µM ileri primer	0.6	0.24 µM
10 µM geri primer	0.6	0.24 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (100 ng)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.14: Bt176 (CRYIA1/CRYIA2) çoğaltımı için kullanılan Nested 1 programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 ºC 63 ºC 72 ºC	40 sn 35 sn 30 dk	35
Son Uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	4 ºC	∞	

Tablo 3.15: Bt176 Nested 2 PCR'ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.7	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
2 mM dNTP	1	0.04 mM
10 µM ileri primer	0.6	0.24 µM
10 µM geri primer	0.6	0.24 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
Nested 1 PCR ürünü (100 ng)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.16: Bt176 (CRYIA3/CRYIA4) çoğaltımı için kullanılan Nested 2 programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 ºC 63 ºC 72 ºC	35 sn 30 sn 35 sn	35
Son Uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	4 ºC	∞	

3.4.4 Roundup Ready (GTS 40-3-2) Soya Çeşidini Belirlemeye Yönelik PCR Analizi

GTS 40-3-2 soya çeşidini belirlemeye yönelik yapılan bu çalışmada öncelikle örneklerdeki soya varlığını saptamak için lektin PCR'ı yapıldı. Lektin soya bitkisine özgü soya proteinini şifreleyen bir gendir ve soya bitkisinin PCR'la tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır. Soya içeren örneklerden (yemler) izole edilmiş DNA'da, soya DNA'sının varlığından emin olmak için lektin genine ait GMO3 ve GMO4 primerleri (Tablo 3.17) kullanılarak PCR yapıldı ve PCR ürünleri %2'lik jelde analiz edildi. Pozitif örneklerde beklenen bant büyüklüğü 118 bç'dir. Lektin PCR'ı için gerekli reaksiyon karışımı ve programı sırasıyla Tablo 3.18 ve Tablo 3.19'da verildi.

Yem örneklerinde GTS-40-3-2 soya çeşidinin PCR ile analizi için ise RRS01-5 ve RRS01-3 primer çifti kullanıldı (Tablo 3.17). PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Pozitif örneklerde beklenen bant büyüklüğü 121 bç'dir. PCR reaksiyon karışımı ve programı sırasıyla Tablo 3.18 ve Tablo 3.19'da verildi.

Tablo 3.17: Lektin primerleri ve dizisi

Hedef	**Primerler**	**Baz dizilimi 5'-3'**	**Ürün Uzunluğu**
Lektin Bölgesi	**GMO3**	5' GCCCTCTACTCCACCCCCATCC 3'	
	GMO4	5'GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG 3'	**118 bç**

Tablo 3.18: Lektin PCR'ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	**Miktarı (µl)**	**Son konsantrasyonu**
Steril dH_2O	17.2	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
2 mM dntp	0.5	0.08 mM
10 µM ileri primer	0.6	0.2 µM
10 µM geri primer	0.6	0.2 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U/µl
Nested 1 PCR ürünü (100 ng)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.19: Lektin PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 ºC 63 ºC 72 ºC	30 sn 30 sn 30 sn	35
Son Uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	4 ºC	∞	

Tablo 3.20: Roundup Ready Belirlenmesinde Kullanılan Primerler

Hedef	Primerler	Baz dizilimi 5’-3’	Ürün Uzunluğu
CTP4/EPSPS	**RRS01-5** **RRS01-3**	5’CCTTTAGGATTTCAGCATCAGTGG3’ 5’ GACTTGTCGCCGGGAATG 3’	**121 bç**

Tablo 3.21: Roundup Ready PCR’ı reaksiyon karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.7	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
2 mM dntp	1	0.08 mM
10 µM ileri primer	0.6	0.24 µM
10 µM geri primer	0.6	0.24 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U/µl
Nested 1 PCR ürünü (100 ng)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.22: Roundup Ready PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ºC	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 ºC 58 ºC 72 ºC	40 sn 40 sn 40 sn	35
Son Uzama	72 ºC	5 dk	1
Bekleme	4 ºC	∞	

4. BULGULAR

4.1. DNA MİKTARI VE SAFLIĞI

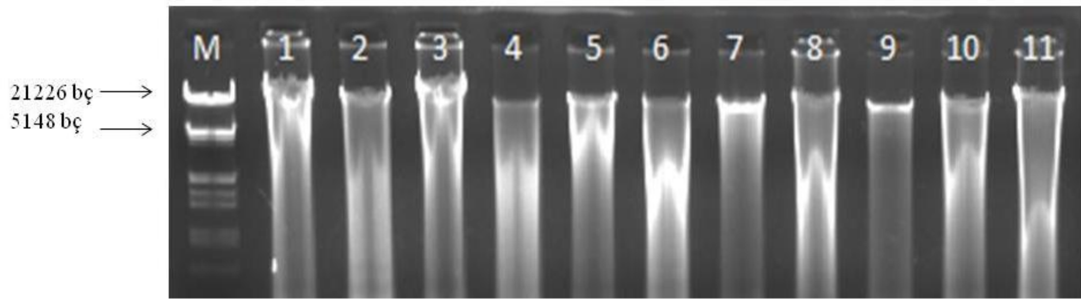
11 yemlik mısır çeşidi, 11 yem ve 11 gıda ürünü ile sertifikalı referans materyallerin tamamından CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların konsantrasyonu, saflığı ve kalitesi gıda örneklerinin çeşidine ve işlenmişlik düzeyine göre farklılık gösterdi. Örneklerin işlenmişlik düzeyleri arttıkça elde edilen DNA'nın konsantrasyonunun ve kalitesinin azaldığı gözlendi. Spektrofotometrik ölçümlerde tüm örneklerde DNA varlığı saptandı, örneklerin büyük çoğunluğunun 200 ng/µl'nin üzerinde DNA içerdiği gözlendi. En düşük DNA konsantrasyonuna sahip örnek 44.8 ng/µl ile mısır cipsi olarak belirlenirken en yüksek DNA konsantrasyonuna sahip örnek ise 657.2 ng/µl ile 9 numaralı yem olarak belirlendi (Tablo 4.1). Örneklerden izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri ise Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verildi.

Tablo 4.1: CTAB ile yapılan izolasyon sonucu genomik DNA'ların miktar ve saflık değerleri

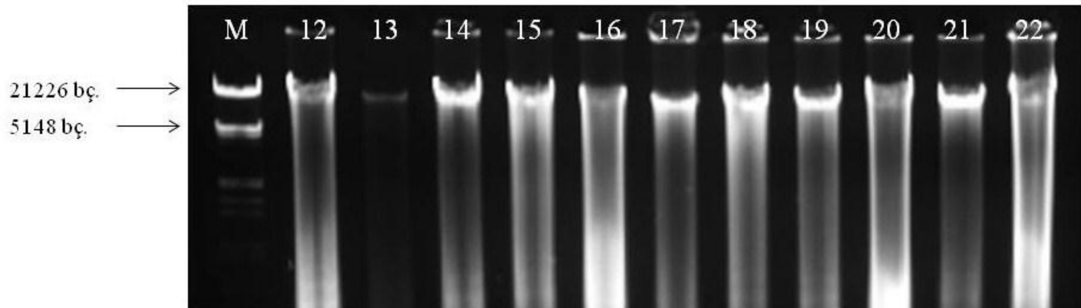
Örnek	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	A260/280	A260/230
Yemlik Mısır 1	424,2	1,87	2,24
Yemlik Mısır 2	256,3	1,90	2,27
Yemlik Mısır 3	539,1	1,88	2,21
Yemlik Mısır 4	210,4	1,87	2,28
Yemlik Mısır 5	364,2	1,89	2,23
Yemlik Mısır 6	176,2	1,85	2,18
Yemlik Mısır 7	169,4	1,96	2,09
Yemlik Mısır 8	370,0	1,59	1,82
Yemlik Mısır 9	122,1	1,86	2,11
Yemlik Mısır 10	287,2	1,88	2,23
Yemlik Mısır 11	643,4	1,93	2,41
Yem 1	607,1	1,88	1,86
Yem 2	188,3	1,92	2,15
Yem 3	434,9	1,87	1,93
Yem 4	106,7	1,82	1,18
Yem 5	651,0	1,66	0,82
Yem 6	375,3	1,68	1,08
Yem 7	281,3	1,64	1,42

Tablo 4.1'in Devamı: CTAB ile yapılan izolasyon sonucu genomik DNA'ların miktar ve saflık değerleri

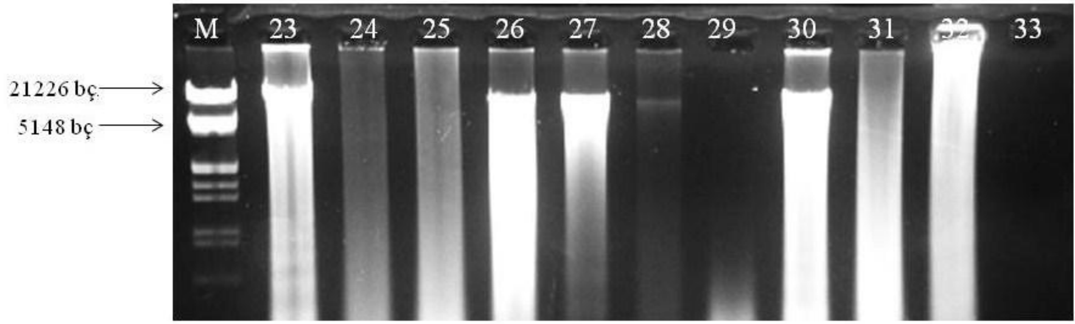
Yem 8	181,2	1,79	1,72
Yem 9	657,2	1,88	2,04
Yem 10	267,0	1,88	1,84
Yem 11	259,3	1,91	2,04
Mısır Unu (Marka1)	66,1	1,87	2,21
Mısır Unu (Marka2)	131,8	1,82	1,98
Cin Mısır (Marka1)	461,1	1,91	2,33
Mikro Dalga Cin Mısır	164,1	1,85	2,22
Mısır Gevreği (Marka1)	497,6	1,97	2,03
Mısır Gevreği (Marka2)	440,8	1,97	2,05
Mısır Cipsi	44,8	1,83	2,02
Bebek Maması (Marka1)	524,6	1,89	2,15
Bebek Maması (Marka2)	545,4	1,83	2,03
Bebek Maması (Marka3)	37,0	1,91	1,40
Tatlı Mısır (Marka1)	163,9	1,83	2,01



Şekil 4.1: Yemlik mısırlardan izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1) Yemlik Mısır 1; 2) Yemlik Mısır 2; 3) Yemlik Mısır 3; 4) Yemlik Mısır 4; 5) Yemlik Mısır 5; 6) Yemlik Mısır 6; 7) Yemlik Mısır 7; 8) Yemlik Mısır 8; 9) Yemlik Mısır 9; 10) Yemlik Mısır 10; 11) Yemlik Mısır 11 M) Markır



Şekil 4.2: Yemlerden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; M) Markır

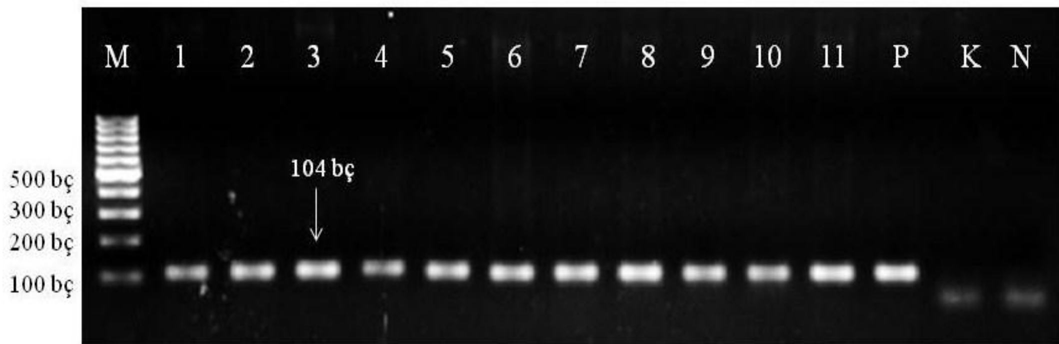


Şekil 4.3: Gıdalardan izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü 23) Mısır Unu-1; 24) Mısır Unu-2; 25) Cin Mısır; 26) Mikrodalga Cin Mısır; 27) Mısır Gevreği-1; 28) Mısır Gevreği-2; 29) Mısır Cipsi; 30) Bebek Maması-1; 31) Bebek Maması-2; 32) Bebek Maması-3; 33) Tatlı Mısır; M) Markır

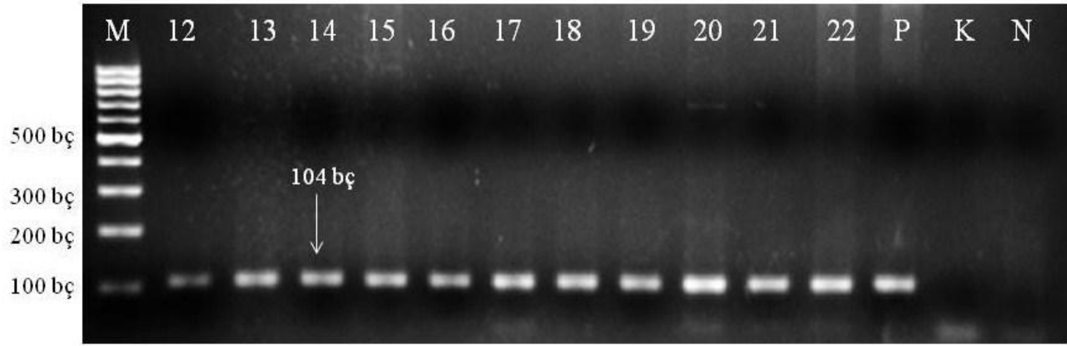
4.2. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ İLE YABANCI GEN İÇEREN ÖRNEKLERİN SAPTANMASI

4.2.1. Zein Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

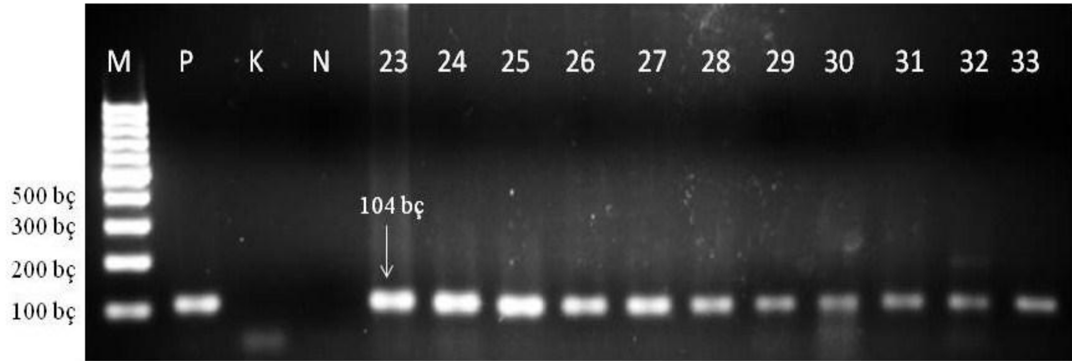
Örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen zein PCR'ı sonucunda tüm örneklerin mısır DNA'sını içerdiği saptandı. Zein-1-L ve Zein-1-R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda otuz üç örnekte de zein geninin 104 bç'lik bölgesi başarıyla çoğaldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.4: Yemlik mısır örneklerinin zein PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 1) Yemlik Mısır 1; 2) Yemlik Mısır 2; 3) Yemlik Mısır 3; 4) Yemlik Mısır 4; 5) Yemlik Mısır 5; 6) Yemlik Mısır 6; 7) Yemlik Mısır 7; 8) Yemlik Mısır 8; 9) Yemlik Mısır 9; 10 Yemlik Mısır 10; 11) Yemlik Mısır 11; P) %0 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (Arpa); M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)



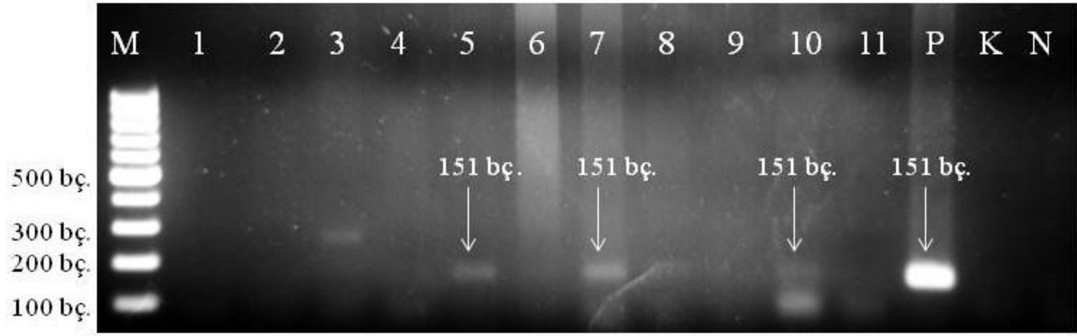
Şekil 4.5: Yem örneklerinin zein PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; P) %0 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (Arpa); M) Markır (Fermentas GeneRuler^{TM} 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)



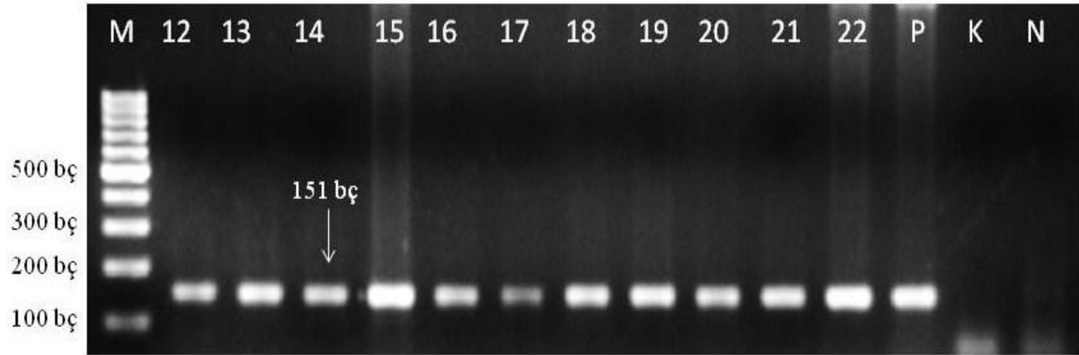
Şekil 4.6: Gıda örneklerinin zein PCR'ı agaroz jel görüntüsü: P) %0 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (Arpa); 23) Mısır Unu-1; 24) Mısır Unu-2; 25) Cin Mısır; 26) Mikrodalga Cin Mısır; 27) Mısır Gevreği-1; 28) Mısır Gevreği-2; 29) Mısır Cipsi; 30) Bebek Maması-1; 31) Bebek Maması-2; 32) Bebek Maması-3; 33) Tatlı Mısır; M) Markır (Fermentas GeneRuler^{TM} 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

4.2.2. 35S Promotoru ve Nos Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması

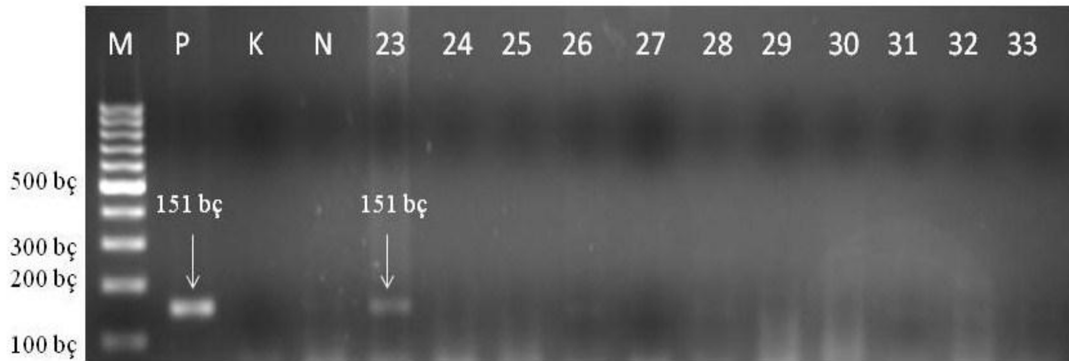
tNOS2-5'/tNOS2-3' primerleri kullanılarak gerçekleştirilen nos terminatörüne özgü PCR reaksiyonları sonucunda yemlik mısır örneklerinin üçünde (3/11) (Şekil 4.7), yem örneklerinin tamamında (11/11) (Şekil 4.8), gıda örneklerinin de birinde (1/11) (Şekil 4.9) beklenen 151 bç.'lik bir bölgenin çoğaltılabilmesi nedeniyle bu örneklerde nos terminatör dizisinin varlığı belirlendi. Diğer örneklerde ise nos terminatör dizisinin varlığı saptanamadı. %1 SRM (pozitif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda pozitif kontrolde beklenen büyüklükte bant elde edilmesi bu durumun, PCR karışımından ya da PCR koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.7: Nos terminatör PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 1 Yemlik Mısır 1; 2) Yemlik Mısır 2; 3) Yemlik Mısır 3; 4) Yemlik Mısır 4; 5) Yemlik Mısır 5; 6) Yemlik Mısır 6; 7) Yemlik Mısır 7; 8) Yemlik Mısır 8; 9) Yemlik Mısır 9; 10) Yemlik Mısır 10; 11) Yemlik Mısır 11; P) %1 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

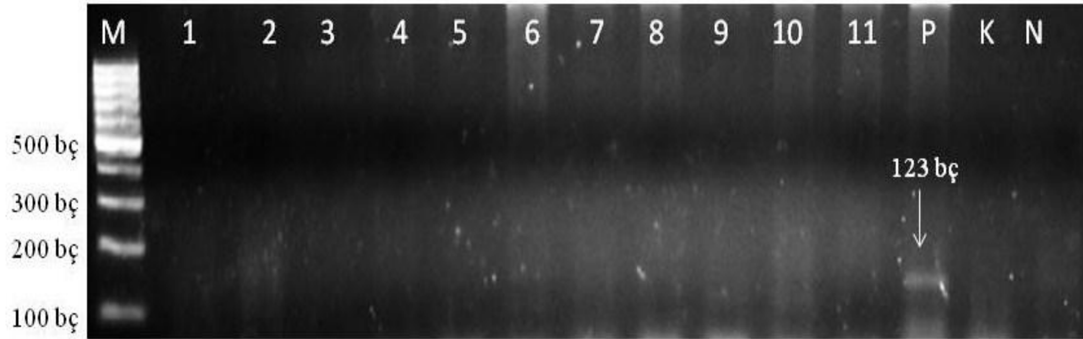


Şekil 4.8: Nos terminatör PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; P) %1 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

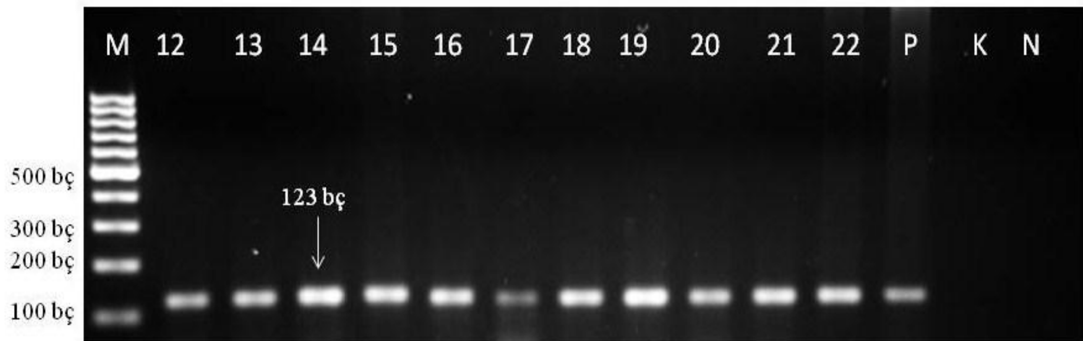


Şekil 4.9: Nos terminatör PCR'ı agaroz jel görüntüsü: P) %1 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); 23) Mısır Unu-1; 24) Mısır Unu-2; 25) Cin Mısır; 26) Mikrodalga Cin Mısır; 27) Mısır Gevreği-1; 28) Mısır Gevreği-2; 29) Mısır Cipsi; 30) Bebek Maması-1; 31) Bebek Maması-2; 32) Bebek Maması-3; 33) Tatlı Mısır; M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

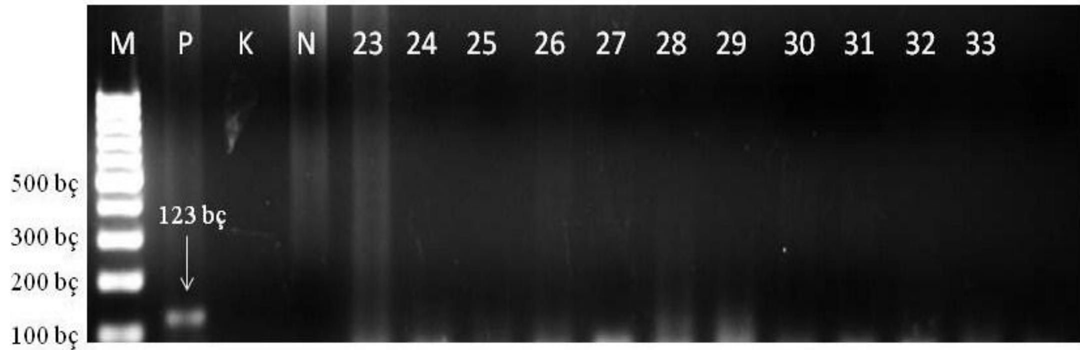
P35S-cf3/P35S-cr4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen 35S promotoruna özgü PCR reaksiyonları sonucunda yem örneklerinin tamamında beklenen 123 bç.'lik bir bölgenin çoğaltılabilmesi nedeniyle 35S promotor dizisinin varlığı belirlendi. Yemlik mısır ve gıda örneklerinde ise hiçbir örnekte 35S dizisinin varlığı belirlenemedi. %1 SRM (pozitif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda pozitif kontrolde beklenen büyüklükte bant elde edilmesi bu durumun, PCR karışımından ya da PCR koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını göstermektedir. Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de P35S-cf3/P35S-cr4 primerleri ile yapılan PCR'lara ait agaroz jel görüntüleri verildi.



Şekil 4.10: 35S Promotor PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 1) Yemlik Mısır 1; 2) Yemlik Mısır 2; 3) Yemlik Mısır 3; 4) Yemlik Mısır 4; 5) Yemlik Mısır 5; 6) Yemlik Mısır 6; 7) Yemlik Mısır 7; 8) Yemlik Mısır 8; 9 Yemlik Mısır 9; 10) Yemlik Mısır 10; 11) Yemlik Mısır 11; P) %1 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)



Şekil 4.11: 35S Promotor PCR'ı agaroz jel görüntüsü: 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; P) %1 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)



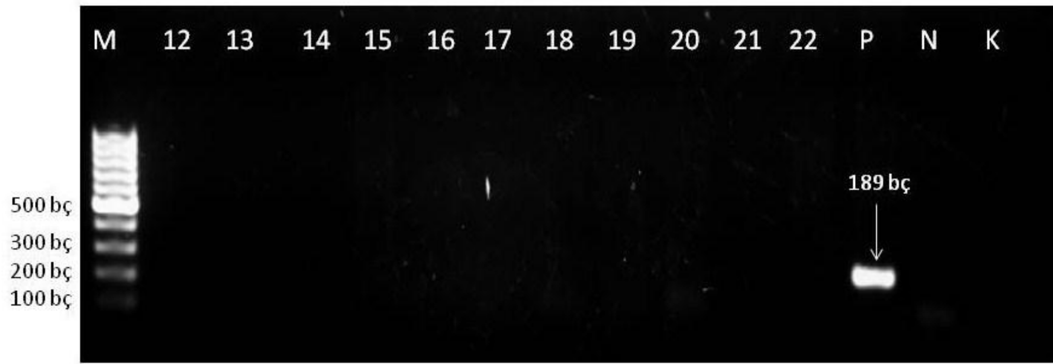
Şekil 4.12: 35S Promotor PCR'ı agaroz jel görüntüsü: P) %1 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); 23) Mısır Unu-1; 24) Mısır Unu-2; 25) Cin Mısır; 26) Mikrodalga Cin Mısır; 27) Mısır Gevreği-1; 28) Mısır Gevreği-2; 29) Mısır Cipsi; 30) Bebek Maması-1; 31) Bebek Maması-2; 32) Bebek Maması-3; 33) Tatlı Mısır; M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

4.2.3 Yemlerde Bt176 Çeşidinin Nested PCR ile Kalitatif Olarak Saptanması

Bt176 mısır çeşidinin özgün olarak belirlenmesi için sırasıyla CRYIA-1, CRYIA-2 ve CRYIA-3, CRYIA-4 primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen Nested 1 ve Nested 2 PCR'ı sonucunda örneklerin hiçbirinde beklenen 189 bç.'lik bir bölge çoğalmadı. Bu durum, örneklerin hiçbirinde Bt176 mısır çeşidine ait dizinin olmadığını gösterdi. %5 Bt176 mısır çeşidine ait SRM (pozitif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda pozitif kontrolde beklenen büyüklükte bant elde edilmesi, bu durumun PCR karışımından ya da PCR koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını gösterdi. Şekil 4.13'te CRYIA-1 ve CRYIA-2 primerleri ile yapılan Nested-1 PCR'ına ait agaroz jel görüntüsü, Şekil 4.14'te ise CRYIA-3 ve CRYIA-4 primerleri ile yapılan Nested-2 PCR'ına ait agaroz jel görüntüsü verildi.



Şekil 4.13: Bt176 Nested 1PCR'ı agoroz jel görüntüsü; 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; P) %5 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler™ 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

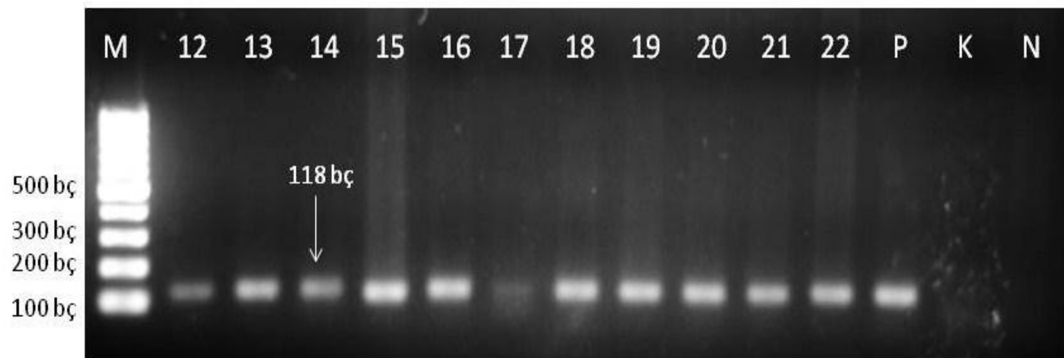


Şekil 4.14: Bt176 Nested 2 PCR'ı agoroz jel görüntüsü; 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; 12) %5 SRM (Pozitif Kontrol); 13) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; 14) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler^{TM} 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

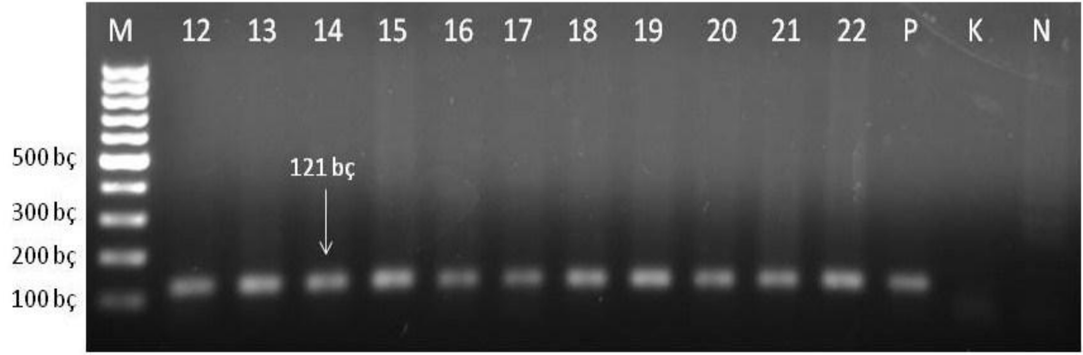
4.2.4. Yemlerde Roundup Ready Soyanın Kalitatif olarak Saptanması

GMO3 ve GMO4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen lektin PCR reaksiyonları sonucunda yem örneklerinin tamamında (11/11) soyaya özgü lektin genine ait 118 bç'lik bölgenin çoğalması nedeniyle lektin geninin varlığı belirlendi. Şekil 4.15'da lektin PCR sonucunu gösteren agaroz jel görüntüsü verildi.

RRS01-5 ve RRS01-3 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen Roundup Ready CTP4-CP4 EPSPS kasedine özgü PCR reaksiyonu sonucunda yem örneklerinin tümünde (11/11) (Şekil 4.16), beklenen 121 bç.'lik bölge çoğaldı. Bu durum yem örneklerinin tamamının Roundup Ready transgenik soya çeşidini taşıdığını gösterdi.



Şekil 4.15: Lektin PCR'ı agoroz jel görüntüsü 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; P) %0 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (Mısır); M) Markır (Fermentas GeneRuler^{TM} 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)



Şekil 4.16: Roundup Ready spesifik PCR'ı agoroz jel görüntüsü; 12) Yem 1; 13) Yem 2; 14) Yem 3; 15) Yem 4; 16) Yem 5; 17) Yem 6; 18) Yem 7; 19) Yem 8; 20) Yem 9; 21) Yem 10; 22) Yem 11; P) %2 SRM (Pozitif Kontrol); K) Kalıp DNA İçermeyen Kontrol; N) Negatif Kontrol (SRM Blank); M) Markır (Fermentas GeneRuler^{TM} 100 bç DNA Ladder, 100-1000 bç)

Bu çalışmada yemlik mısır, mısır içerikli yem ve gıdalardan oluşan toplam 33 örnekte yapılan analizler sonucunda, örneklerin tamamında zein geni belirlendi. Sadece hayvan yemlerine uygulanan lektin PCR'ı sonucunda ise yem örneklerinin tamamında lektin geni olduğu saptandı. Yemlik mısırların 3'ünde, hayvan yemlerinin 11'inde ve gıdaların 1'inde olmak üzere toplam 15 örnekte yabancı gen belirlendi. Kalitatif PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: Kalitatif PCR Sonuçları

Örnekler	Zein	Lektin	NOS	35S	Pozitif kontrol	Negatif kontrol	Kalıp DNA İçermeyen Kontrol	Yabancı Gen Varlığı
Yemlik Mısır 1	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 2	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 3	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 4	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 5	+	/	+	-	+	-	-	+
Yemlik Mısır 6	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 7	+	/	+	-	+	-	-	+
Yemlik Mısır 8	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 9	+	/	-	-	+	-	-	-
Yemlik Mısır 10	+	/	+	-	+	-	-	+
Yemlik Mısır 11	+	/	-	-	+	-	-	-
Yem 1	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 2	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 3	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 4	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 5	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 6	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 7	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 8	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 9	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 10	+	+	+	+	+	-	-	+
Yem 11	+	+	+	+	+	-	-	+
Mısır Unu-1	+	/	+	-	+	-	-	+
Mısır Unu-2	+	/	-	-	+	-	-	-
Cin Mısır	+	/	-	-	+	-	-	-
Mikro Dalga Cin Mısır	+	/	-	-	+	-	-	-
Mısır Gevreği-1	+	/	-	-	+	-	-	-
Mısır Gevreği-2	+	/	-	-	+	-	-	-
Mısır Cipsi	+	/	-	-	+	-	-	-
Bebek Maması-1	+	/	-	-	+	-	-	-
Bebek Maması-2	+	/	-	-	+	-	-	-
Bebek Maması-3	+	/	-	-	+	-	-	-
Tatlı Mısır-1	+	/	-	-	+	-	-	-

(/) işareti bulunan örnekler için lektin PCR'ı yapılmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler konusundaki tartışmalara rağmen bu bitkilerin ekim alanları her yıl artmaya devam etmektedir. Buna paralel olarak genetik mühendisliği teknolojisi ile üretilen gıda ve yemlerde de artış olmaktadır. Pek çok ülkede bu gıda ve yemlerin biyogüvenliği önemli bir tartışma konusu oluşturmaktadır. Genetiği değiştirilmiş ürünlerin kullanımının uzun vadede çevre ve insan sağlığı üzerindeki olası etkileri nedeniyle kontrollü şekilde üretimi ve tüketiciye sunulması gereklidir. Bu amaçla birçok ülkede Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) ile ilgili düzenlemeler yapılmış ve etiketlenmeleri yasalarla zorunlu hale getirilmiştir. Avrupa Birliğinde EC 1829/2003 ve 1830/2003 yönetmelikleri GDO'ların piyasaya sürülmesini ve etiketlenmesini düzenlemektedir. Bu düzenlemelere göre ürünün ancak % 0.9'un üzerinde bir değerde GDO içermesi durumunda etiketlenmesi gerekmektedir. Ülkemizde de 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan ''Biyogüvenlik Kanunu''nun yürürlüğe girmesiyle bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek risklerin engellenmesi, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi kontrol altına alınmıştır. Biyogüvenlik kanunu ile Avrupa Birliği'nin yasal düzenlemelerine benzer olarak, GDO'lu ürünlerin içeriğindeki genetik değişim oranının %0.9'un üzerinde olması halinde etiketleme kurallarına göre etiketlenmeleri zorunlu tutulmuştur.

Bu tez çalışmasında, yemlik mısırlarda, mısır içerikli gıda ve yemlerde genetik değişikliklerin saptanmasına yönelik olarak yabancı gen temeline dayalı genetik analizler yapıldı. Türkiye'deki marketlerden satın alınan çeşitli işlenmişlik düzeyindeki gıdalar (mısır unu, mısır gevreği, mısır cipsi, mısır içeren bebek

mamaları, cin mısır, konserve tatlı mısır), ülkemizin farklı bölgelerinden edinilmiş yemlik mısırlar ve bu yemlik mısırların hammadde olarak kullanıldığı mısır ve soya içerikli hayvan yemleri yabancı gen içerikleri bakımından tarandı. Genetik değişim belirlenen örneklerde ileri kalitatif analizler yapılarak içerdikleri GDO çeşitleri belirlendi.

CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen DNA izolasyonları sonucunda, elde edilen DNA'ların miktarının, saflığının ve kalitesinin işlenmişlik düzeyine bağlı olarak değiştiği ve özellikle işlenmişlik düzeyleri diğer gruplara göre daha fazla olan gıda örneklerinden elde edilen DNA'ların kalitesinin daha düşük olduğu gözlendi. Gıdalar içerisinde en düşük konsantrasyonda DNA, işlenmişlik düzeyi en yüksek örneklerden biri olan mısır cipsinden izole edildi. Cipse göre daha az işlenmiş olan bebek mamaları ve gevrek örneklerinden ise daha yüksek konsantrasyonlarda DNA elde edildi. Gıda örneklerine göre daha az işlenmişlik düzeyine sahip olan yemlerden izole edilen DNA'ların kalitesinin daha yüksek olduğu, ancak 5, 6 ve 7 numaralı yem örneklerinin saflıklarının beklenen değerden daha düşük olduğu belirlendi. Bunun, izolasyon sırasında proteinlerin yeterince uzaklaştırılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Teorik olarak, DNA'daki (260/280) absorbsiyon oranının 1.80'den düşük olduğu ölçümler proteinin, 2.0'den yüksek olduğu ölçümler ise RNA'nın uzaklaştırılamamasından kaynaklandığını gösterir (Yoke-Kqueen, 2011). Bir diğer grup olan yemlik mısırlardan elde edilen DNA'ların saflıklarının 8 numaralı yemlik mısırın dışında beklenen değerler arasında olmasında, yemlik mısırların işlenmemiş olması ve izolasyonda endospermin uzaklaştırılıp sadece embriyo kısımlarının kullanılmasının etkisinin olduğu düşünülmektedir. Böylece yağ, karbonhidrat ve protein gibi diğer bileşenlerin işlemin başında büyük ölçüde uzaklaştırılması diğer örneklere göre çok daha yüksek saflıkta ve miktarda DNA'ların elde edilmesine neden oldu.

Hayvan yemlerinden ve işlenmemiş tohum materyallerinden yüksek miktarda DNA izole edildi. Bu iki gruptan izole edilen DNA konsantrasyonlarının %32'si 400 ng/µl'nin üzerinde, %37'si 250 ng/µl'nin, %23'ü ise 150 ng/µl'nin üzerindedir. Hiçbir örnekte ise 100 ng/µl'nin altında bir değer elde edilmedi. Gıdalardan izole edilen DNA'ların arasında ise 44.8 ng/µl (mısır cipsi), 66.1 ng/µl (mısır unu) gibi

düşük konsantrasyonluların yanında 524.6 ng/µl ve 545.4 ng/µl gibi yüksek konsantrasyonda DNA'lar da bulunmaktadır. Bu durumun farklı işlenmişlik düzeylerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu duruma uygunluk gösteren bir çalışma Yoke-Kqueen ve arkadaşları (2011) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada da işlenmemiş örnekler, hayvan yemleri ve işlenmiş gıdalar olmak üzere üç farklı grup bulunmaktadır. Bu gruplar içinde izole edilen en yüksek DNA konsantrasyonu ortalama 517.60 ng/µl ile hayvan yemlerine aittir. İşlenmemiş örneklere ait DNA konsantrasyonu ortalama 306.41 ng/µl iken, en düşük ortalama ise 107.4 ng/µl ile gıda ürünlerine aittir. Bu durum Ahmed ve arkadaşlarının (2002) yüksek sıcaklık ve gıdaların diğer işlenme yöntemlerinin DNA'nın bozulmasına neden olduğunu bildirdikleri çalışma ile uygunluk göstermektedir.

Bu çalışmada tüm örneklerden farklı konsantrasyonlarda da olsa DNA izole edilebilmesi CTAB DNA izolasyon yönteminin farklı işlenmişlik düzeyindeki örneklerde güvenle kullanılabilecek bir yöntem olduğunu göstermektedir. CTAB yöntemi bitkilerden saf DNA izolasyonunda, bitki kaynaklı materyal ve gıdalarda polisakkaritlerin DNA'dan uzaklaştırılmasında etkili bir yöntemdir (Jasbeer ve diğ, 2008). Mafra ve arkadaşlarına göre (2008), bir ekstraksiyon yönteminin etkinliği DNA'nın saflık ve miktar olarak değerlendirilmesinin yanı sıra PCR'da etkin bir şekilde çoğalabilmesi ile de ölçülebilir. Bu tez çalışmasında yüksek işlenmişlik düzeyindeki mısır cipsi gibi DNA verimi az olan örnekler de bile 1.82 absorbsiyon oranı (A260/280) gibi yüksek saflık derecesi ile izolasyon sağlanarak izole edilen DNA'ların PCR'da başarıyla kullanılabileceği gösterildi (Bkz. Şekil 4.3 ve Şekil 4.9). PCR'a dayalı GDO analiz çalışmalarında CTAB DNA izolasyon yönteminin başarıyla kullanıldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Lipp. ve diğ., 1999; Berdal ve Host-Jensen, 2001, Olexova ve diğ., 2004, Peano ve diğ., 2004, Moriuchi ve diğ., 2007). Mafra ve arkadaşlarının (2008) ekstraksiyon yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada soya içerikli işlenmiş gıdalardan CTAB yöntemi ile başarılı şekilde DNA izole edilmiştir. Gryson ve arkadaşları (2004) soya içeren bisküvi ve çukulata gibi ileri düzeyde işlenmiş gıdalarda 5 farklı izolasyon yöntemini karşılaştırmışlar ve CTAB yönteminin uygulamada uzun zaman almasına rağmen en etkili izolasyon yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

PCR, GDO analizinde yaygın bir biçimde kullanılan en önemli moleküler yöntemlerdendir (Anklam ve diğ., 2002; Berdal ve Holst-Jensen, 2001; James ve diğ., 2003; Taverniers ve diğ., 2004). PCR'ın yüksek duyarlılıkta, güvenilir ve tekrarlanabilir özellikte olması birçok genetiği değiştirilmiş ürünün analizinde kullanılmasına neden olmuştur. Rhandawa ve arkadaşları da (2006) PCR yöntemini mısır ve soyada yabancı gen saptanması için başarılı şekilde uygulamışlardır (Rhandawa ve ark., 2006).

Bu çalışmada yemlik mısır, yem ve gıda örneklerinin tümünde yabancı genlerin varlığı, Avrupa Birliği tarafından onaylanmış pek çok transgenik mısırda bulunan düzenleyici diziler olan CaMV 35S promotor ve *A. tumafaciens* nos terminatör dizilerinin bu dizilere özgü primerler ile gerçekleştirilmiş kalitatif standart PCR analizleriyle araştırıldı. Günümüzde ekimi yapılan transgenik ticari mısır (Bt11, GA21, MON810, MON863, NK603, MON89034, DAS59122, DAS1507, MIR604, MON88017, DAS1507xNK603, NK603xMON810, Bt11xGA21, MON88017x MON810, MON863x NK603, 59122x1507x NK603, MON88017x MON810, MON863x MON810, MON863xMON810xNK603, 1507x59122, MON89034xNK603, 59122xNK603) ve soya çeşitlerinin tamamı (GTS 40-3-2, A2704-12, MON 89788) bu dizilerin her ikisini ya da en az birini içermektedir.

35S dizisinin varlığının belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen kalitatif PCR'lar sonucunda yemlik mısır ve gıda örneklerinden hiçbirinde 35S dizisinin varlığı belirlenemedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan %2 GDO içeren Bt11 sertifikalı referans materyalinden istenilen büyüklükteki bir bantın elde edilmesi (Bkz. Şekil 4.10 ve Şekil 4.12) bu durumun PCR reaksiyonu koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını gösterdi. Elde edilen sonuç, yemlik mısır ve gıda örneklerinin 35S dizisini içermediğini düşündürdü. Yem örneklerinden elde edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen kalitatif PCR sonucunda ise on bir örneğin tamamında beklenen 123 bç'lik bölgenin çoğalması nedeniyle 35S dizisinin varlığı belirlendi (Bkz. 4.11).

Nos dizisinin varlığını belirlemeye yönelik yapılan kalitatif PCR'lar sonucunda gıda örneklerinden sadece birinde, yemlik mısır örneklerinden üçünde ve yem

örneklerinin ise tamamında beklenen 151 bç'lik bölgenin çoğalması nedeniyle nos terminatör dizisinin varlığı belirlendi.

CaMV 35S promotor ve nos terminatör dizilerine ait tarama sonucunda otuz üç örneğin on beşinde yabancı gen belirlendi. Yabancı gen olduğu belirlenen bu örneklerden bir gıda ve üç yemlik mısırın 35S promotor dizisi içermeyip nos terminatör dizisi içermesi nedeniyle bu örneklerin GA21 veya MIR604 mısır çeşitlerinden (GMDD, 2012) biri olduğu düşünülmektedir. Yem örneklerinin tamamında ise hem 35S hem de nos terminatör dizisinin çoğalması bu örneklerin GDO'lu olduğunu göstermekte ancak yabancı genin niteliği hakkında bilgi vermemektedir. Bu durum yem örneklerinde daha ileri seviyedeki analizlerin yapılmasını zorunlu kılmıştır.

Yem örneklerinde gerçekleştirilen taramalar sonucunda 35S dizisinin saptanması bu örneklerde 35S dizisine sahip mısır çeşitlerinin olabileceğini düşündürdü. Ancak 35S dizisine sahip 16 adet transgenik mısır çeşidinin örneklerde taranamayacak olması nedeniyle ileri kalitatif tarama için Avrupa Birliğince onaylı transgenikler arasında en çok kullanım alanına sahip transgenik mısır çeşitlerinden biri olan Bt176'ya özgü nested PCR ile gen spesifik (CRY1Ab'ye özgü) tarama yapıldı. Nested PCR iki primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen ve böylelikle PCR duyarlılığını arttırarak düşük düzeylerdeki GDO varlığını bile belirlemeye yarayan yöntemlerden biridir (Zimmermann, 1998). Zimmermann ve arkadaşları Avrupa mısır kurduna karşı dirençli Mon810 transgenik mısır çeşidini spesifik olarak belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada Nested PCR metodunun transgenik mısır çeşitlerini belirlemede uygun bir yöntem olduğunu göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan Nested PCR ile kalitatif tarama sonucunda hiçbir örnekte Bt176'ya ait gen dizisi belirlenemedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan %5 GDO içeren Bt176 sertifikalı referans materyalinden istenilen büyüklükteki bantların elde edilmesi, bu durumun PCR reaksiyonu koşullarından kaynaklanan bir sorun olmadığını ve Nested PCR'ın GDO çeşitlerinin tanımlanmasında kullanılabilecek güvenilir bir yöntem olduğunu gösterdi. Bu çalışmada, yem örneklerinde Bt176 transgenik mısır çeşidine ait cry1A(b) geninin saptanmaması Bt176 transgenik çeşidinin Biyogüvenlik Kurulunca

yemlerde kullanımı onaylanan transgenik mısır çeşitleri arasında yer almaması ile uyumluluk göstermektedir.

Yem örneklerinin mısır DNA'sının yanısıra soya DNA'sını da içermesi, örneklerdeki GDO kaynağının soya olabileceğini düşündürdü. Yem örneklerinde nos ve 35S dizilerinin her ikisinin de çoğalması ve hem 35S hem de nos terminatör içeren Avrupa birliğince onaylanmış tek transgenik soya çeşidinin GTS 40-3-2 olması nedeniyle GTS-40-3-2'nin taşıdığı CTP4-CP4 EPSPS gen kasedine spesifik primerler ile PCR yapıldı. PCR sonucunda on bir örneğin tamamında CTP4- CP4 EPSPS gen dizilerinin çoğaltılabilmesi yem örneklerinde GTS 40-3-2 soya çeşidinin varlığını gösterdi.

Yemlerin yapısının hemen tamamını soya ve mısırın oluşturması yemlerde yapılacak olan GDO analizlerinde çeşide özgü taramanın daha ayrıntılı şekilde yapılmasını gerektirmektedir. İleriki çalışmalarla 35S promotorunun bulunduğu diğer transgenik mısır çeşitlerine özgü primerler ile kalitatif PCR'lar yapılarak yemlerin diğer transgenik mısır çeşitlerini içerip içermediği gösterilebilir. Ayrıca yabancı gen içerdiği belirlenen örneklerde bu yabancı genin miktarını belirlemeye yönelik yapılabilecek araştırmalar (Real Time PCR) ile bu miktarın Biyogüvenlik yasasında eşik değeri olarak kabul edilen %0.9'u aşıp aşmadıkları belirlenebilir.

KAYNAKLAR

AHMED, F.E., 2002, Detection of genetically modified organisms in foods, *Trends in Biotechnology*, 20(5):215-223.

AL-BABILI, S., YE, X., LUCCA, P., POTRYKUS, I., BEYER, P., 2001, Biosynthesis of beta-carotene (provitamin A) in rice endosperm achieved by genetic engineering. Novartis Found Symp 236:219-28; discussion 228-232.

ANDRADE H., Breeding in Ecuador: facing increasing late blight severity. In *Proceedings of the Global Initiative on Late Blight* Volume 1:1999 Mar 16-19; Quito, Ecuador. Lima, Peru: GILB; 1999:38-40.

ANKLAM, E., GADANI F., HEINZE, P., PIJNENBURG, H. VE EEDE G.V.D., 2002, Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214(1), 3-26.

ANON, A., 1998, Agrochemical risks and benefits. *Chemistry in Britain*, 43:20-24.

ANON, A., 2001, No Traces of Modified DNA in Poultry Fed on GM Corn, *Nature* 409: 657.

ARI, Ş., 2001, *Doğrudan Gen Aktarım Teknikleri*, ÖZCAN, S., GÜREL, E., BABAOĞLU, M., Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Bölüm 16, S.Ü. Baskı, Konya, Türkiye.

ARMSTRONG, D.G., 1988, The Implications of Biotechnology for Livestock Production, Nutrition, and Health, *Nutrition abstracts and reviews*, 58: 415-426.

AVRUPA BİRLİĞİ'NDE ve TÜRKİYE'DE ÇEVRE MEVZUATI, 2001, *Türkiye Çevre Vakfı Yayını,* Ankara, ISBN: 975-7250-61-9.

AZADI, H., HO, P., 2008, Genetically modified and organic crops in developing countries: A review of options for food security, *Biotechnology Advances*, 28 (2010) 160–168.

BERDAL, K.G., HOLST-JENSEN, A., 2001, Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses, *European Food Research Technology*, 213 (2001), pp. 432–438.

BRADY, C.J., MCGLASSON, W.B., PEARSON, J.A., MELDRUM, S.K. ve KOPELİOVİTCH, E., 1985, Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium, and firmness in tomato fruit, *Journal of the American Society for Horticultural Science,* 110 (2), 254-258.

BROOKES, G., 2008, Bitki Ziraati: Biyoteknolojinin Etkileri, Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik, Çeviri Editörleri; H.A. Öktemm, M. Yücel, 2012, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. Bölüm 1: 1-19.

BUSCH, U., MUHLBAUER, B., SCHULZE M., ZAGON, J., 1999, Screening- und spezifische Nachweismethode fur transgene Tomaten (Zeneca) mit der Polymeraskettenreaktion, Deutsche Lebensmittelrundschau, Deutsche Lebensmittelrundschau, Heft 2:52–56.

CAMPBELL and REECE, 2008, “Biyoloji”, Çev. Prof. Dr. Ertunç Gündüz, Prof. Dr. Ali Demirsoy ve Prof. Dr. İsmail Türkan, Palme Yayıncılık.

CARTAGENA BİYOGÜVENLİK PROTOKOLÜ, 2000, Montreal.

COLON L.T., Trends in late blight resistance breeding in Western Europe. In *Proceedings of the Global Initiative on Late Blight* Volume 1: 1999 Mar 16-19; Quito, Ecuador. Lima, Peru: GILB; 1999:40-41.

CRL-GMFF (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed), 2007, Maize seeds sampling and DNA extraction- Report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds, http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm [Ziyaret Tarihi: 03.04.2012]

CUSHMAN, J.C., Bohnert HJ., (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance, *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2): 117-24.

DEMİR, A., SEYİS F., KURT O., 2005, Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar: I. Bitkiler, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 2006,21(2):249-260.

DE LA RIVA, G.A., GONZALEZ-CABRERA, J., VAZQUEZ-PADRON, R., AYRA-PARDO, C., 1998, *Agrobacterium*: a natural tool for plant transformation, Elect. J. Biotech., 1:2-16.

DPT, 2000 VIII. Beş Yıllık Kalkınma Planı: Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Ankara, DPT: 2515. ÖİK: 533.

DUCK N., EYOLA S., (1997) Use of transgenes to increase host plant resistance to insects: Opportunities and challenges. In: Carozzi N, Koziel M (eds), *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants,* pp. 1-20, Taylor & Francis, Bristol.

DUVICK D.N., 1961 Protein granules of maize endosperm cells, *Cereal Chem*. 38: 374-385.

EHLERS, B., STRAUCH, E., GOLTZ, M., KUBSCH, D., WAGNER, H., MAIDHOF, H., BENDIEK, J., APPEL, B., BUHK, H-J., 1997, Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR, Bundesgesundhbl 4:118–121.

EINSPANIER, R., KLOTZ, A., KRAFT, J., AULRICH, K., POSER, R., SCHAGELE, F., JAHREIS, G. and FLACHOWSKY, G., 2001. The Fate of Forage Plant DNA in Farm Animals: A Collaboration Case-Study Investigating Cattle and Chicken Fed Recombinant Material. European Food Research and Technology 212:129-134.

ELENIS, D.S., KALOGIANNI, D.P., GLYNOU, K., IOANNOU, P.C., CHRISTOPOULOS, T.K., 2008, Advance in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 347-354.

ERGUN, A., ÇOLPAN, İ., YILDIZ, G., KÜÇÜKERSAN, S., TUNCER, Ş.D., YALÇIN, S., KÜÇÜKERSAN, M.K., ŞEHU, A., 2004, *Yemler yem hijyeni ve teknolojisi*, 2. Baskı ANKARA.

FAO, 2006, Maize: International Market Profile, Grains Team Food and Agriculture Organization of the United Nations Economic and Social Department Trade and Markets Division.

GILL SS, COWLES E.A., PIETRANTONIA P.V., (1992) The mode of action of Bacillus thuringiensis endotoksin, *Annual Review of Entomology*, 37: 615-636.

GMDD”: a database of GMO detection methods, http://gmdd.shgmo.org/primer/list, [Ziyaret Tarihi: 01.02.2012].

GMDD: a database of GMO detection methods, http://gmdd.shgmo.org/primer/list, [Ziyaret Tarihi: 04.03.2012].

GOLOVKIN, M.V., ABRAHITM, M., MEROCZ, S., BOTTKA, S., FEHER, A. ve DUDITS, D., 1993, Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embyrogenic protoplasts, *Plant Sci* , 90, 41–52.

GORDON-KAMM, WJ., SPENCER, TM., MANGANO, ML., ADAMS, TR., DAINES, RJ., START, WG., O'BRIEN, JV., CHAMBERS, SA., ADAMS, WR., WILLETTS, NG., et al., Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell*. 1990 Jul;2(7):603–618.

GRAVES, A.C.F., GOLDMAN, S.L., 1986, The transformation of Zea mays seedlings with Agrobacterium tumefaciens, *Plant Mol Biol*, 7(1), 43–50.

GREENBERG B.M., GLICK B.R., (1993) The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants. In: Glick BR, Thomson JE (eds), Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, London.

GRYSON, N., MESSENS, K., DEWETTINCK, K., 2004, Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1357–1363.

HALLBERG G.R., Pesticide pollution of ground water in the humid United States. *Agric Ecosyst Environ* 1989, 26:299-367.

HAMAKER, B.R. ve LARKINS, B.A., 2002, Maize Food and Feed: A Current Perspective and Consideration of Future Possibilities, (ed.) KHACHATOURIANS, G.G. ve diğ., *Transgenic plants and crops*, Marcel Dekker, New York, 0-8247-0545-9

HAMILTON, T.S., HAMILTON, B.C., JOHNSON, B.C., MITCHELL, H.H. 1951, The dependence of the physical and chemical composition of the corn kernel on soil fertility and cropping system, *Cereal Chem*. 28: 163-176.

HEMMER, W., 1997, *Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*, BATS-Report 2/1997, Basel, Switzerland.

HERNANDEZ M., PLA M., ESTEVE T., PRAT S., PUIGDOMENECH P., FERRANDO A., 2003, A specific real-time quantitative PCR system for event MON810 in Maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence, *Transgenic Res.* 12: 179-189.

HOBSON, G.E., 1965, The Ripening of Tomato Fruit as Affected by the Injection of Certain Chemicals, *Journal of Experimental Botany*, 16(3), 411-422.

HOFTE H., WHITELEY H.R., (1998) Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis. Microbiol. Rev., 53: 242-255.

HOLCK A., VAITILINGOM M., DIDIERJEAN L., RUDI K., 2002, 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize, *Eur Food Res Technol* 214:449–454.

HOLST-JENSEN, A., RONNING, S.B, LOVSETH, A. ve BERDAL, K.G., 2003, PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(8), 985–993.

HOTZEL, H., MLLER, W., SACHSE, K., 1999, Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients, *European Food Research and Technology,* 209 (3-4), 192-196.

HUG, K., 2008, Genetically modified organisms: do the benefits outweigh the risks?, *Medicina (Kaunas)*, 2008; 44(2).

HUPFER, C., HOTZEL, H., SACHSE, K. ve ENGEL, K.H., 1998, Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain

reaction, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.*, 206(3), 203-207.

IBELGAUFTS, H., 1993. Gentechnologie von A-Z. Studienausgabe. VCH Verlag.

JAMES, C., 2011, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, ISAAA Brief No. 43, ISAAA, Ithaca, NY.

JAMES, D., SCHMIDT, A.M., WALL, E., GREEN, M., MASRI, S., Reliable detection of geneticallymodified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003), pp. 5829–5834

JASBEER, K., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K. and SON, R. 2008. Application of DNA and Immunoassay Analytical Methods for GMO Testing in Agricultural Crops and Plant-Derived Products, *ASEAN Food Journal* 15(1):1-25.

KEMPKEN., 2004, Gentechnik bei Pflanzen. 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag.

KHUMNIRDPETCH, V., INTARACHOTE, U., TREEMANCE, S., TRAGOONROONG, S. and THUMMABOOD, S., 2001. Detection of GMOs in the Broilers that Utilized Genetically Modified Soybean Meals as a Feed Ingredient. Plant and Animal Genome IX Conference, January, San Diego, USA (Poster 585).

KLOTZ, A., MAYER, J. and EINSPANIER, R., 2002, Degradation and Possible Carry over of Feed DNA Monitored in Pigs and Poultry. *European Food Research and Technology* 214: 271-275.

KRAMER, M., SANDERS, R., BOLKAN, H., WATERS, C., SHEENY, R.E. ve HIATT, W.R.**,** 1992, Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance, *Postharvest Biology and Technology*, 1(3), 241-255.

KRAMER, M.G. ve REDENBAUGH K., 1994, Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene:The FLAVR SAVRTM tomato story, *Kluwer*, 79(1), 293-297.

KORTH, K.L., 2008, Transgenik Bitkilerle İlgili Genler ve Özellikler, Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik, Çeviri Editörleri: H.A Öktem, M. Yücel, 2012, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti., Bölüm 8:193-216

LEE, T.C., ZENG, J., BAILEY, M., SIMS, S.R., SANDERS, P.R. ve FUCHS, R.L., 1995, Assessment of the Equivalence of the Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 Protein Produced in Escherichia coli and European Corn Borer Resistant, *Plant Physiol. Suppl.*, 108, 151.

LEEMANS J., LANGENAKENS J., DE GREVE H., DEBLAERE R., VAN MONTAGU M., SCHELL J., (1982) Broad host range cloning vectors derived from the W-plasmid Sa. *Gene*, 19: 361-364.

LIPP, M., BRODMANN, P., PIETSCH, K., PAUWELS, J. ve ANKLAM, E., 1999, IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder, *Journal of AOAC International,* 82(4), 923-928.

MAFRA, I., SILVA, S.A., MOREIRA, E.J.M.O., DA SILVA, C.S.F., BEATRIZ, M., OLIVEIRA, P.P., 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products, *Food Control* 19, 1183–1190

MANIATIS, T., FRITCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratuary manual*, Cold spring harbor laboratory press, NY.

MARGARIT, E., REGGIARDO, M. I., VALLEJOS, R. H. and PERMINGEAT, H. R., 2006, Detection of BT transgenic maize in foodstuffs, *Food Research International* 39(2): 250-255.

MATSUOKA T., KURIBARA H., AKIYAMA H., MIURA H., GODA Y., KUSAKABE Y., ISSHIKI K., TOYODA M., HINO A., 2001, A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize, *J. Food Hyg Soc Japan* 42:24–32.

MATSUOKA T., KURIBARA H., TAKUBO K., AKIYAMA H., MIURA H., GODA Y., KUSAKABE Y., ISSHIKI K., TOYODA M., HINO A., 2002, Detection of Recombinant DNA segments introduced to Genetically Modified Maize, *J. Agricultural Food Chem* 50:2100–2109.

MAY, J. B., 1987, Wet Milling: Process and Products. In S. A. Watson, and Ramstad, Paul E. (Ed.), Corn: Chemistry and Technology (pp. 377-397). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists

MEYER R., CHARDONNENS F., HUBNER P., LUTHY J., 1996, Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products, *Z. Lebensmittel-Untersuchung und-Forsch.,* 203:339–344

MOON, B. Y., HIGASHI, S. I., GOMBOS, Z., N. MURATA., 1995, Unsaturation of the Membran Lipids of Chloroplasts Stabilizes the Photosynthetic Machinery Against Low Temperature Photoinhibition in Transgenic Tobacco Plants. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 6219-6223.

MORIUCHI, R., MONMA, K., SAGI, N., UNO, N., KAMATA, K., 2007. Applicability of quantitative PCR to soy processed foods containing Roundup Ready Soy. *Food Control* 18, 191–195

MURRAY, H.G. ve THOMPSON, W.F.,1980, Rapid extraction of high molecular weight DNA, *Nucleic Acids Res,* 8(19), 4321–4325.

NOTTINGHAM, S., 1998, Eat Your Genes-How Genetically Modified Food is Entering Our Diet, Zed Books Ltd., London, New York

OERKE E.C., *Crop Protection and Crop Production.* Amsterdam: Elsevier; 1994

OLEXOVA , L., DOVICOVICOVA, L., KUCHTA, T., 2004. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *European Food and Research Technology* 218, 390–393

ÖKTEM, H.A., 2004, Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi, Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed) Ofset Baskı, 208-226.

ÖKTEM, H.A., 2004, Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi, Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed) Ofset Baskı, 190-202.

ÖZCAN, S., 2009, Modern Dünyanın Vazgeçilmez Bitkisi Mısır: Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Mısırın Tarımsal Üretime Katkısı, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2(2): 01-34, 2009 ISSN:1308-0040

ÖZTÜRK, D., 2011, *Mısır Kökenli Gıdalarda Yabancı Gen Taraması*, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

PEANO, C., SAMSON, M. C., PALMIERI, L., GULLI, M., & MARMIROLI, N., 2004, Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6962–6968.

PERSLEY, G. J., 1990, Beyond Mendel's Garden: Biotechnology in the Service of World Agriculture. Wallingford, UK: CAB International. 155 s.

PIETSCH K., WAIBLINGER H-U., BRODMANN P., WURZ, A., 1997, Screeningverfahren zur Identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher, Deutsche Lebensm Rundsch, Lebensmittel, 93:35–38.

QUERCI, M., MAZZARA, M. (2006) *Characteristics of RoundUp Ready Soybean, MON810 maize and Bt-176 maize*. In: Querci M. ve diğ. (ed.), The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, Session 7, European Communities, Luxemburg.

QUING-HU, M., YAN-RU, S., 1997, Expression of Tomato Antisense ACC Synthase Gene in Transgenic Tobacco and Its Role in Shoot Formation, *Acta Botanica Sinica*, 39 (11): 1047-1052.

SARHAN, F., J. DANYLUK., 2000. Risikoabschaetzung und Nachzulassung-Monitoring Transgener Pflanzen. Sachstandsbericht. TAB-Arbeitsbericht Nr. 68. Berlin: Büro für Technikfolgen-Abschaetzung beim Deutschen Bundestag.

SCHAUB P., AL-BABILI S., BEYER P., 2005, Why is Golden Rice golden (yellow) and not red. *Plant Physiology* 138:441- 450.

SHEEHY, R.E., PEARSON, J., BRADY C.J. ve HIATT, W.R. ., 1987, Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase, *Molecular and General Genetics MGG*, 280(1-2), 30-36.

SOMMA, M., 2006, *Extraction and Purification of DNA,Session-4*, (ed.) QUERCI, M. ve diğ., Training course on: The Analaysıs of Food Samples for The Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, European Communities, Luxembourg.

STUDER, E., DAHINDEN, I., LUTHY, J., and HUBNER, P., 1997. Nachweis des Gentechnisch Veranderten 'Maximizer'-Mais Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene 88, 515-524.

RANDHAWA, G. J. and FIRKE, P. K. 2006. Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polymerase chain reaction, *Indian Journal of Biotechnology* 5: 510-513.

RESMİ GAZETE, 2010, Sayı: 27533, Biyogüvenlik Kanunu, Kanun no.5977.

RONNING, S.B., VAITILINGOM, M., BERDAL, K.G., HOLST-JENSEN, A., 2003, Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified BT11 maize (Zea mays), *European Food Research and Technology*, (2003) 216:347–354

TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., BOUVET, J., 1991, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, Plant Molecular Biology, 17:1105–1109

TAVERNIERS, I., WIENDELS, P., VAN BOCKSTAELE, E., DE LOOSE, M., 2001, Use of cloned DNA fragments for event specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products, *European Food Research and Technology,* 213:417–424

TERRY, C., HARRIS, N., 2001, Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries, *Eur. Food Res. Technol.* 2001, *213*, 425-431.

THOMZIK, J.E. 1996. Gene transfer in plants. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer: Special Issue. Vol: 49: 1-120.

USDA, 2012, United States of Department Agriculture http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=zema, [Ziyaret Tarihi: 25.05.2012]

VALENZUELA, P., MEDINA, A., RUTTER, W. S., AMMERER, G., HALL, B. D., 1982 Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast, *Nature,* 298: 347

WATSON, B., CURRIER, T.C., GORDON, M.P., CHILTON, M.D., NESTER, E.W., (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium Tumefaciens. *Journal of Bacteriology,* 123: 255-264.

WHITE, P.J., JOHNSAN, L.A., 2003, Corn Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, USA

WURZ, A., WILLMUND, 1997, Foods produced by means of genetic engineering. In: Schrieber, GA, Bögl KW (eds) 2nd status report. BgVV-Heft 1/1997, pp 115–117.

YOKE-KQUEEN, C., YEE-TYAN, C., SIEW-PING, K. and SON, R., 2011, Development of multiplex-PCR for Genetically Modified Organism (GMO) detection targeting EPSPS and Cry1Ab genes in soy and maize samples, *International Food Research Journal,* 18: 515-522 (2011).

ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J. (1974) Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains, *Journal of Molecular Biology*, 86: 109-127.

ZHANG, S.Z, YANG, B.P., FENG, C.L. and TANG, H.L, 2005, Genetic Transformation of Tobacco with the Trehalose Synthase Gene from *Grifola frondosa* Fr. Enhances the Resistance to Drought and Salt in Tobacco, *Journal of Integrative Plant Biology Formerly Acta Botanica Sinica*, 47 (5): 579−587

ZIMMERMANN, A., LINIGER, M., LUTHY, J., PAULI, U., 1998, *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 31:664–667

ZIMMERMANN, A., LUTHY, J., PAULI, U., 2000, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33:210–216

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'da doğdum. Liseyi 2004 yılında Gaziosmanpaşa Plevne Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2010 yılında lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladım.